



UNIVERSIDAD  
DE GRANADA



CSIC  
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

**Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra”**

# **Caracterización de una nueva diana farmacológica en *Leishmania* spp. e identificación de compuestos activos frente a *Trypanosoma brucei***



**Marta Martínez García**

Portada: cuadro de Augusta Asberry.

Esta pintora comenzó su obra cerca del año 1992 inspirada en el arte africano. Las vestimentas de los bailarines son creaciones propias de la artista después de estudiar la relación que tenían las telas con los rituales y danzas, y como resultado de este estudio los bailarines han tomado una vida propia, pero sin alejarse de los conceptos básicos del arte y del diseño de África.



UNIVERSIDAD  
DE GRANADA



Instituto de Parasitología y Biomedicina

“López-Neyra”

**Caracterización de una nueva diana  
farmacológica en *Leishmania* spp. e  
identificación de compuestos activos  
frente a *Trypanosoma brucei***

Director de Tesis

Dr. José María Pérez-Victoria Moreno de Barreda

Memoria presentada por la Licenciada **Marta Martínez García** para optar  
al grado de Doctor por la Universidad de Granada en el Programa de  
Doctorado en Bioquímica y Biología Molecular.

Junio 2018



D. JOSÉ MARÍA PÉREZ-VICTORIA MORENO DE BARREDA,  
Científico Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas,

CERTIFICA:

Que el trabajo titulado “**Caracterización de una nueva diana farmacológica en *Leishmania spp.* e identificación de compuestos activos frente a *Trypanosoma brucei*”**, ha sido realizado bajo su dirección en el Departamento de Bioquímica y Farmacología Molecular del Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra” (CSIC) de Granada por la doctoranda **Marta Martínez García**, garantizando al firmar esta tesis doctoral, que hasta donde nuestro conocimiento alcanza, durante la realización de la misma, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Director de la tesis

**Fdo. Dr. José María Pérez-Victoria Moreno de Barreda**

Científico Titular del CSIC

Doctoranda

**Fdo. Marta Martínez García**





Esta Tesis Doctoral se ha realizado en el Departamento de Bioquímica y Farmacología Molecular del Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra” (CSIC) de Granada y ha sido financiada por una beca predoctoral de Formación de personal investigador (FPI) del Ministerio de Economía y Competitividad, dentro del Proyecto SAF2011-28215, correspondiente a la convocatoria 2012 del programa Subprograma Ayudas FPI-MICINN. Parte de los resultados de la Tesis Doctoral han sido publicados (o están siendo sometidos a revisión ) en:

- **Martínez-García, M, Campos-Salinas, J, Cabello-Donayre, M, Pineda-Molina, E, Gálvez, FJ, Orrego, LM, Sánchez-Cañete, MP, Malagarie-Cazenave, S, Koeller, DM and Pérez-Victoria, JM.** “LmABCB3, an atypical mitochondrial ABC transporter essential for *Leishmania major* virulence acts in heme and cytosolic Iron/Sulfur clusters biogenesis”. *Parasites and Vectors*. 2016; 5;9:7. doi: 10.1186/s13071-015-1284-5.
- **Martínez-García M, Bart JM, Campos-Salinas J, Valdivia E, Martínez-Bueno M, González-Rey E, Navarro M, Maqueda M, Cebrián R, Pérez-Victoria JM.** “Autophagic-related cell death of *Trypanosoma brucei* induced by bacteriocin AS-48”. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*. 2018;12;8(2): 203-212. doi:10.1016/j.ijpddr.2018.03.002.
- **Fernández-Pastor I<sup>1</sup>, Martínez-García M<sup>1</sup>, Medina-O'Donnell M, Rivas F, Martínez A, Pérez-Victoria J.M\*, Parra A\* (1equal authors).** “Semi-synthesis of  $\omega$ - hydroxyalkyl-carbonate derivatives of hydroxytyrosol as anti-trypanosome agents”. Submitted
- **Carvalho L, Martínez-García M, Pérez-Victoria I, Manzano JI, Yardley V, Gamarro F, Pérez-Victoria JM.** “The Oral Antimalarial Drug Tafenoquine Shows Activity against *Trypanosoma brucei*”. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015; 59(10):6151-60. doi: 10.1016/j.ejmech.2016.04.047.
- **Belmonte-Reche E, Martínez-García M, Peñalver P, Gómez-Pérez V, Lucas R, Gamarro F, Pérez-Victoria JM, Morales JC.** “Tyrosol and hydroxytyrosol derivatives as antitrypanosomal and antileishmanial agents”. *Eur J Med Chem*. 2016;119:132-40. doi: 10.1016/j.ejmech.
- **Belmonte-Reche E, Martínez-García M, Guédin A, Zuffo M, Arévalo-Ruiz M, Doria F, Campos-Salinas J, Maynadier M, López-Rubio JJ, Freccero M, Mergny JL, Pérez-Victoria JM, Morales JC.** “G-Quadruplex Identification in the Genome of Protozoan Parasites Points to Naphthalene Diimide Ligands as New Antiparasitic Agents”. *J Med Chem*. 2018; 61(3):1231-1240. doi: 10.1021/acs.jmedchem.7b01672.

- **Pérez-Victoria JM, Bavchvarov BI, Torrecillas IR, Martínez-García M, López-Martín C, Campillo M, Castanys S, Gamarro F.** "Sitamaquine overcomes ABC-mediated resistance to miltefosine and antimony in *Leishmania*". Antimicrob Agents Chemother. 2011;55(8):3838-44. doi: 10.1128/AAC.00065-11.
- **Zuffo M, Stucchi A, Campos-Salinas J, Cabello-Donaire M, Martínez-García M, Belmonte-Reche E, Pérez-Victoria JM\*, Freccero M,\* Morales JC\*, and Doria F\*.** "Structure-activity studies on carbohydrate naphthalene diimide conjugates as potential antiparasitic drugs". Submitted.

Además, como resultado de colaboraciones con otros miembros del laboratorio, se ha publicado:

- **Cabello-Donayre M, Malagarie-Cazenave S, Campos-Salinas J, Gálvez FJ, Rodríguez-Martínez A, Pineda-Molina E, Orrego LM, Martínez-García M, Sánchez-Cañete MP, Estévez A, and Pérez-Victoria JM.** "Trypanosomatid parasites rescue heme from endocytosed hemoglobin through lysosomal HRG transporters". Molecular Microbiology. 2016;101(6):895-908.  
doi: 10.1111/mmi.13430.
- **Cabello-Donayre M, Herráez E, Orrego LM , Vargas P, Martínez-García M, Campos-Salinas J, Pérez-Victoria I, Vicente B, Marin JJG and Pérez-Victoria JM.** "*Leishmania* heme uptake involves LmFLVCRb, a novel porphyrin transporter required for parasite virulence". Submitted.



*A mis padres*

*A mi hijo*



*“La gota horada la piedra...no por su fuerza, sino por su constancia”*

Publio Ovidio Nasón, poeta romano.



# Agradecimientos

---

Decía un compañero, que realizar una tesis doctoral requería muchas horas en soledad y autodisciplina y si bien es cierto, yo he tenido la grandísima suerte de sentirme acompañada y apoyada en cada momento. Quienes me conocen, saben que soy de lágrima fácil, así que alguna se me escapará escribiendo esta sección...El resto, las dejo para el día de la tesis.

En primer lugar, sin duda, quiero agradecer a José María el confiar en mí. Gracias por haberme dado la oportunidad de formar parte de este gran equipo. Por tu paciencia, tus consejos y tu buen carácter. Gracias por los cursos, congresos, seminarios...En definitiva, gracias por toda la formación recibida y por ser “agente causal” de mi doctorado.

Gracias Paco Gamarro y Santiago Castanys por vuestro tiempo, vuestras recomendaciones y vuestras críticas, sumamente importantes. Gracias a Juan Carlos Morales por haberme permitido colaborar en varios de sus trabajos y muchísimas gracias a Mercedes Maqueda, Manuel Martínez y Eva Valdivia por vuestro interés, vuestros consejos y vuestra buena predisposición a ayudar siempre.

Mi andadura científica comenzó en el departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias y aunque hace ya bastantes años que cambié las bacterias por los parásitos, la amistad y el cariño por los que fueron mis compañeros sigue intacto; gracias a Fadwua, Sonia, Terete, Carmen, Manolo, Platero, Rubén “el bueno”, Jessy, Estefanía, Arantxa, Marina y a Miguel...

Agradecer, a todo el personal del Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neya”: Pedidos, limpieza y esterilización, cultivos, citometría, microscopía, proteómica, secuenciación, animalario...Especialmente a Laura por tu generosidad y tu dedicación y a Clara por tu paciencia y ayuda cada vez que me encontraba con un ratón rebelde. Como diría mi abuelo, “con una rueda no anda el carro” y todos sois imprescindibles para el buen funcionamiento del instituto. A todos mis compañeros/amigos: Efrés, Mati, Pablo, Rose, Jean Mathieu, Estévez, Luis, Nacho, Ana, David, Sebas, Darién, Inma, Anita...Ha sido un auténtico placer compartir almuerzos, conversaciones y alguna que otra cervecita con vosotros. De manera muy especial a Rubén Perandrés, por esa inocencia y bondad que te caracteriza; Michael, por tu buen humor incluso en los días más grises; Manu, por tu ayuda, tus consejos y por ser único en tu especie; Adri, mi “morenasa” preferida, tu dulzura (avalada por el premio sacarosa) hacen que tu compañía siempre sea un lujo; Raquel, porque esa mezcla canario-alemana te hacen inigualable y porque no hay nadie en el mundo que imite como tú al Maneki-neko; Ardiini (Elena), por tu vitalidad, tus ganas de comerse el mundo y porque mejor persona no la hay; y a Paco, por ponerle banda sonora a mi recorrido todos estos años.

A las que de forma cariñosa llamo “las niñas” del 203-204. Gracias Mery, Vero, Raquel y Talia. Gracias por las conversiones, las confidencias, el apoyo y el cariño que me habéis brindado todos estos años y que me brindáis día a día. Mi gratitud especialmente a toda la gente que forma o ha formado parte del laboratorio 208. De todos he aprendido y de todos me llevo algo...Sophie, por crear tan buena armonía en el laboratorio; Estela, por realizar todo el modelado computacional; Fran, por enseñarnos a trabajar con levaduras y demostrarnos que tener 1,5 millones de esterilines en la poyata no es pretexto para no trabajar; Jenny, por tu ayuda en el modelo animal, en microscopía y en general, por todo lo que has compartido conmigo; Paola, por tu apoyo constante, tu ternura y porque te haces querer nada más conocerte. Quiero hacer mención especial a Lina y a María, me va a ser difícil plasmar todo lo que se me pasa por la mente en estos momentos y encima resumirlo en unas pocas líneas. María, eres generosa, muy trabajadora y una gran persona. Ha sido un placer trabajar todos estos años contigo; Lina, mi hermana colombiana, eres la única persona que puede dejarme “tirada” en León y, sin

embargo, no importarme, porque pasar tiempo a tu lado, es un privilegio. Has sido muy importante en mi etapa pre-doctoral y eres fundamental en mi vida. Muchísimas gracias a las dos por todo, sin vosotras no habría podido defender (literalmente) esta tesis. Habéis sido mis manos en la distancia y seréis mis amigas siempre.

A mi gente de Cozvíjar, pueblo al que cada uno llama de manera diferente (Cofias, Cofijar, Covijar...) en el que tenía una gran familia sin saberlo. Gracias Silvia, Pichi, Oliver, Nuria, Sergio, Cris, Nico, Nuria, Casares, Irene, Vicky, Germán, Maribel, Fer, Bau, Nuri, Vero, Angu, Ceci, Conchi, Pierrez, Isa, Paqui, Carmen...A mis amigas ejidenses, especialmente a María del Mar, Eli y Mónica, por ver en mí cualidades que yo aún ando buscando. A mis "vrienden van Groningen", ciudad en la que llevo viviendo un año y que si no fuera por el frío, la lluvia y la distancia sería perfecta para instalarse de por vida...Especialmente a Paty, sólo tú eres capaz de venir un lunes a última hora de la tarde a mi casa con un pastel y cantarme "Las Mañanitas" más especiales del mundo.

A mi familia (consanguínea y política), gracias a todos por vuestro interés, vuestro apoyo y vuestro ánimo. A Antonio, Isabel, Gustavo y Sandra, y como no, gracias "chacha". Especialmente gracias a mi suegra. Carmen sin ti nada de esto hubiera sido posible. Gracias por cuidar de mi niño mientras me pasaba interminables horas en el laboratorio y no quejarte jamás. Gracias por tu cariño y por cuidarnos a todos e incluso en los momentos más duros de tu vida. Tengo clarísimo que nada de esto hubiera sido posible sin tu ayuda incondicional y te lo agradeceré siempre. Antonio, tú te fuiste demasiado pronto, pero coge asiento por allí arriba que también estás invitado a mi tesis y presente en todos nosotros.

A mi abuelo, el hombre más sabio y con más clase que conozco. Abuelo, no imaginas la ilusión que me hace que me acompañes este día, con tus casi 97 años de edad. Con apenas 4-5 años, me enseñaste a sumar y restar. Conforme pasaba el tiempo me enseñaste las tablas de multiplicar, a hacer raíces cuadradas y aún recuerdo tus divisiones con decimales infinitas...Entonces no hacía falta ni ordenador, ni tablet ni móvil...Tu forma de entretenerme era enseñándome y a día de hoy me das lecciones a cada instante.

A mi hermano y mi cuñada...Qué deciros que no os haya dicho ya, entre nosotros sobran las palabras...Gracias por estar conmigo siempre, por confiar en mí, por apoyarme...Por hacerme partícipe de vuestra vida y formar parte de la mía. ¡¡Os quiero mucho!!

A mis padres...Muchísimas gracias mamá y papá por vuestro trabajo, vuestro sacrificio y vuestra dedicación. Gracias por apoyarme siempre en mis decisiones, por mostrarme vuestra discrepancia cuando veis que me equivoco y por enseñarme que las cosas hay que ganárselas con trabajo, respeto y disciplina. Sois mis muros de contención, sin vosotros nada tiene sentido. Esta tesis es vuestra.

Por último, a ti Rubén...No hay palabras que describan la grandísima persona que eres ni suficientes páginas que pueda rellenar para agradecer todo lo que haces por mí. Gracias por compartir tu vida conmigo y darme el mayor regalo que tengo, mi niño, lo más bonito del mundo. A ti Antonio, te pido perdón por haberte robado tanto tiempo en ciertas ocasiones y te doy las gracias porque desde que naciste, soy la persona más feliz del mundo.

## Resumen

---

*Leishmania* spp. y *Trypanosoma* spp. son parásitos protozoarios pertenecientes a la familia *Trypanosomatidae*. Estos parásitos son responsables de la leishmaniasis (*Leishmania* spp.) en regiones tropicales y subtropicales, de la enfermedad de Chagas (*Trypanosoma cruzi*) en América, así como de la enfermedad del sueño en los humanos (HAT) y del nagana en animales dentro del continente africano (*Trypanosoma brucei*). Estas patologías se incluyen dentro de las denominadas Enfermedades Tropicales Desatendidas, ya que suponen un grave problema de importancia médica y veterinaria en las poblaciones más pobres de África, Asia y América.

El tratamiento de estas enfermedades se basa en un arsenal farmacológico anticuado, tóxico, de administración compleja y frente al que se han desarrollado resistencias clínicas. Además, el acceso al mismo es costoso y suele ser inasequible para los países que sufren estas enfermedades, por lo que la estigmatización y la exclusión social (sobre todo de las mujeres) causadas por estas enfermedades acrecientan el sufrimiento y dificultan su desarrollo.

Existe, por lo tanto, la necesidad de identificar y desarrollar nuevos fármacos y estrategias que permitan prevenir o curar estas enfermedades. En los últimos años, la mitocondria de protozoos parásitos se ha convertido en una diana prometedora para nuevos enfoques terapéuticos. Además de la respiración celular, este orgánulo desempeña papeles esenciales relacionados con la regulación de la homeostasis del hierro, incluida la síntesis y el tráfico de porfirinas y la generación de clústeres de hierro y azufre (ISC). Como el hierro es esencial en tripanosomátidos como *Leishmania*, la ruta que controla su uso es un blanco potencial para el desarrollo de fármacos.

En mamíferos, se ha propuesto que dos ABCs mitocondriales de tipo half-transporters, ABCB6 y ABCB7, están involucrados en el transporte de porfirinas y en el ensamblaje de ISC, respectivamente. En este trabajo describimos la caracterización funcional de LmABCB3, una nueva proteína en *L. major*, que muestra una similitud de secuencia significativa con ABCB6 y ABCB7 humanos.

Los resultados obtenidos muestran que LmABCB3 es esencial para la supervivencia del parásito, tanto *in vitro* como en modelos animales de la enfermedad, debido a su papel en la generación de hemo y de ISC citosólicos. Por lo tanto, LmABCB3 podría representar una nueva diana farmacológica.

Por otra parte, debido a las resistencias desarrolladas por los parásitos frente a los tratamientos convencionales, los péptidos antimicrobianos están atrayendo poderosamente la atención como posibles compuestos parasiticidas. Los resultados presentados en esta tesis, muestran a AS-48 como la primera bacteriocina (péptido antimicrobiano producido por bacterias) que tiene actividad frente a *T. brucei*. Así, AS-48 mata a las formas sanguíneas de diferentes subespecies de este parásito a concentraciones más bajas que las requeridas para los fármacos actualmente utilizados para tratar la HAT, siendo inocuo para las células humanas. Además, su efecto tripanocida se lleva a cabo por un mecanismo de acción diferente al descrito para su efecto en bacterias, estando relacionado con la inducción de una respuesta autofágica en el parásito.

Finalmente, hemos evaluado en las formas sanguíneas de *T. brucei* la actividad tripanocida *in vitro* de compuestos de origen natural o sintéticos incluyendo: i) la tafenoquina y la sitamaquina, aminoquinolinas desarrolladas por GlaxoSmithKline por su potencial para el tratamiento y prevención de la malaria; ii) derivados de compuestos naturales como el tirosol, hidroxitirosol, resveratrol, quercetina, curcumina y ácido gálico, compuestos que presentan numerosas propiedades biológicas y beneficios potenciales para la salud, incluidos efectos neuroprotectores, cardioprotectores, anticancerígenos, antiinflamatorios, antioxidantes y antimicrobianos; iii) posibles ligandos de G-quadruplex (G4) del parásito. Estos G4 son estructuras secundarias que se forman en secuencias del ADN y ARN ricas en guaninas, vinculadas a la regulación de importantes procesos biológicos como la replicación y la transcripción de determinados genes, por lo que pueden ser la clave para el desarrollo de nuevas terapias dirigidas contra el cáncer; Algunos de los compuestos ensayados en esta tesis mostraron actividades prometedoras en el rango nanomolar.



# ÍNDICE DE CONTENIDOS

---

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1. Enfermedades causadas por parásitos tripanosomátidos</b>	<b>3</b>
1.1 Leishmaniasis	3
1.1.1 Generalidades	3
1.1.2 Agente etiológico	7
1.1.3 Ciclo de vida	9
1.1.4 Relación parásito-vector	12
1.1.5 Establecimiento de la infección	12
1.1.6 Manifestaciones clínicas de la enfermedad	14
1.1.7 Tratamiento farmacológico	17
1.2 Enfermedad del Sueño	25
1.2.1 Generalidades	25
1.2.2 Agente etiológico	29
1.2.3 Ciclo de vida	30
1.2.4 Mecanismos de evasión parasitaria	33
1.2.5 Inmunidad innata en primates/humanos	35
1.2.6 Tratamiento farmacológico	38
<b>2. Particularidades bioquímicas, celulares y moleculares en tripanosomátidos</b>	<b>41</b>
<b>3. Transportadores ABC mitocondriales</b>	<b>46</b>
3.1 Transportadores ABC	46
3.2 Organización estructural y mecanismo de acción	46
3.3 Transportadores ABC mitocondriales	48
3.4 Transportadores ABC en <i>Leishmania</i> spp.	53
3.4.1 Subfamilia ABCA	53
3.4.2 Subfamilia ABCB	53
3.4.3 Subfamilia ABCC	54
3.4.4 Subfamilia ABCG	55
<b>4. Biogénesis de clústeres Fe/S</b>	<b>56</b>
<b>5. Autofagia en tripanosomátidos</b>	<b>58</b>

<b>6. Péptidos antimicrobianos</b>	<b>63</b>
6.1 Bacteriocinas	66
6.2 Enterocina AS-48	67
<b>OBJETIVOS</b>	<b>73</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>79</b>
<b>I. MATERIALES</b>	<b>81</b>
<b>1. Líneas celulares y animales de experimentación</b>	<b>81</b>
1.1 Cepas bacterianas	81
1.2 Levaduras	81
1.3 Parásitos	81
1.4 Células	82
1.5 Ratones	82
<b>2. Vectores de clonación y expresión</b>	<b>82</b>
<b>3. Medios de cultivo</b>	<b>83</b>
3.1 Medios de cultivos utilizados en bacterias	83
3.2 Medios de cultivos utilizados en levaduras	83
3.3 Medios de cultivos utilizados en parásitos	84
3.4 Medios de cultivos utilizados en células	84
3.5 Suplementos para medios de cultivo	84
<b>4. Tampones, soluciones y reactivos</b>	<b>85</b>
4.1 Tampones utilizados en los estudios funcionales de parásitos	85
4.2 Tampones usado para electroforesis de ADN	85
4.3 Tampones usados para la precipitación con hemina-agarosa	85
4.4 Soluciones usadas para la extracción de ADN genómico en <i>L. major</i>	85
4.5 Soluciones usadas para electroforesis de proteínas	86
4.6 Soluciones usadas para Western Blot e Inmunodetección	86
4.7 Soluciones usadas para Southern Blot	86
<b>5. Fármacos</b>	<b>87</b>
<b>6. Anticuerpos</b>	<b>88</b>
<b>7. Oligonucleótidos</b>	<b>89</b>
<b>II. MÉTODOS</b>	<b>94</b>
<b>1. Alineamiento de secuencias y análisis filogenéticos</b>	<b>94</b>

<b>2. Cultivo y manipulación de bacterias</b>	<b>94</b>
2.1 Cultivo <i>in vitro</i>	95
2.2 Crioconservación y congelación	95
<b>3. Cultivo y manipulación de levaduras</b>	<b>95</b>
3.1 Cultivo <i>in vitro</i>	95
3.2 Crioconservación y congelación	96
3.3 Transformación de levaduras	96
<b>4. Cultivo y manipulación de <i>Leishmania</i></b>	<b>97</b>
4.1 Cultivo <i>in vitro</i>	97
4.2 Crioconservación y congelación	98
4.3 Transfección de <i>Leishmania</i>	98
<b>5. Cultivo y manipulación de <i>Trypanosoma brucei</i></b>	<b>99</b>
5.1 Formas sanguíneas	99
5.1.1 Cultivo <i>in vitro</i>	99
5.1.2 Crioconservación y congelación	99
5.2 Formas procíclicas	99
5.2.1 Cultivo <i>in vitro</i>	99
5.2.2 Crioconservación y congelación	100
<b>6. Cultivo y manipulación de células THP1</b>	<b>100</b>
6.1 Cultivo <i>in vitro</i>	100
6.2 Crioconservación y congelación	100
<b>7. Cultivo y manipulación de células MRC-5</b>	<b>101</b>
7.1 Cultivo <i>in vitro</i>	101
7.2 Crioconservación y congelación	101
<b>8. Clonaje de genes/ORF de <i>Leishmania</i> en plásmidos de expresión de <i>Leishmania</i> y <i>Saccharomyces</i></b>	<b>102</b>
8.1 Aislamiento de ADN genómico de <i>L. major</i>	102
8.2 Amplificación del ADN	102
8.3 Digestión del ADN con enzimas de restricción	103
8.4 Tratamiento con fosfatasa alcalina	103
8.5 Reacción de ligación	103
8.6 Selección de los transformantes positivos	103
8.7 Aislamiento de ADN plasmídico de cultivos bacterianos	104
8.8 Preparación de células quimio-competentes	104
8.9 Transformación de <i>E. coli</i> por choque térmico	104
8.10 Clonaje de ORF en pGEMT	105
8.11 Tecnología GATEWAY	106
8.11.1 Clonaje en el vector pENTR/D-TOPO	107
8.11.2 Clonaje en vector de expresión pDR299	108

8.12 Mutagénesis dirigida	109
<b>9. Complementación funcional en levaduras</b>	<b>110</b>
9.1 Efectos de la expresión heteróloga de LmABC3 en levaduras ScΔATM1	110
9.1.1 Ensayos de crecimiento de levaduras en medio solido	110
9.1.2 Ensayos de crecimiento de levaduras en medio liquido	110
<b>10. Deleción de un alelo del gen LmABCB3</b>	<b>111</b>
<b>11. Análisis de la expresión génica</b>	<b>112</b>
11.1 Aislamiento de ARN total de <i>L. major</i>	112
11.2 Síntesis y amplificación de ADN complementario	112
11.3 Análisis de los resultados	113
<b>12. Hibridación ADN-ADN (Southern Blot)</b>	<b>113</b>
12.1 Transferencia alcalina por capilaridad	113
12.2 Marcaje de la sonda con digoxigenina	114
12.3 Hibridación y lavados	115
12.4 Detección inmunológica	116
<b>13. Microscopía de fluorescencia</b>	<b>117</b>
<b>14. Detección de proteínas (Western Blot)</b>	<b>117</b>
14.1 Transferencia a la membrana	117
14.2 Detección inmunológica	118
<b>15. Infección in vitro de macrófagos THP1</b>	<b>119</b>
<b>16. Modelo murino de leishmaniasis cutánea</b>	<b>119</b>
<b>17. Formación de hemo <i>de novo</i> a partir de PPIX</b>	<b>120</b>
<b>18. Ensayos de precipitación con hemin-agarosa</b>	<b>121</b>
<b>19. Modelado computacional</b>	<b>121</b>
19.1 Análisis de acoplamiento molecular	121
19.2 Herramientas bioinformáticas usadas	122
<b>20. Ensayos de citotoxicidad de los distintos compuestos</b>	<b>122</b>
20.1 <i>Leishmania</i>	122
20.2 <i>T. brucei</i>	123
20.3 Células MRC-5	124
<b>21. Obtención y marcaje de AS-48</b>	<b>124</b>
<b>22. Purificación de VSG</b>	<b>124</b>
<b>23. Análisis del mecanismo de entrada de AS-48</b>	<b>125</b>

23.1 Citotoxicidad en función de la temperatura	125
23.2 Determinación de la permeabilización de la membrana Plasmática	125
23.3 Determinación de la entrada de AS-48 mediante citometría de flujo	125
23.4 inhibición de la endocitosis mediada por clatrina	126
<b>24. Análisis de la interacción AS-48-VSG</b>	<b>126</b>
24.1 Microscopia de fluorescencia	126
24.2 Ensayo tipo ELISA	127
<b>25. Determinación de la autofagia</b>	<b>128</b>
25.1 TEM	128
25.2 Monitorización de autofagosomas ATG8.2	128
<b>26. Análisis estadísticos</b>	<b>128</b>
<b>27. Compuestos con actividad tripanocida utilizados</b>	<b>128</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>131</b>
Bloque I: Caracterización funcional de la proteína LmABCB3 y validación como posible diana farmacológica	131
1. LmABCB3 es un transportador ABC atípico al presentar una extensión N-terminal única (UNE)	134
2. LmABCB3 se localiza en la mitocondria	139
3. LmABCB3 es una proteína esencial para <i>Leishmania</i>	141
4. La delección heterocigota de un alelo de ABCB3 reduce severamente la virulencia de <i>L. major</i>	142
5. LmABCB3 es requerido para la biosíntesis de hemo mitocondrial	148
6. LmABCB3 es necesario para la maduración de clústeres Fe/S	150
<b>Discusión</b>	<b>157</b>

Bloque II: Identificación de nuevos compuestos activos frente a <i>T. brucei</i>	166
▪ Estudio de la actividad tripanocida in vitro de la bacteriocina AS-48 y caracterización de su mecanismo de acción	167
<b>1. Actividad tripanocida de la bacteriocina AS-48</b>	169
<b>2. AS-48 tiene un efecto tripanocida independiente de su capacidad de formar poros en la membrana plasmática del parásito</b>	171
<b>3. Papel de la endocitosis mediada por clatrina en la internalización de AS-48</b>	173
<b>4. AS-48 interacciona con VSG en la superficie del parásito</b>	175
<b>5. AS-48 mata a <i>T. brucei</i> induciendo autofagia</b>	177
<b>Discusión</b>	180
▪ Evaluación de la actividad tripanocida in vitro de distintos compuestos de origen natural y sintético	187
<b>1. La sitamaquina y tafenoquina muestran actividad frente a <i>T. brucei</i></b>	189
<b>2. Evaluación de la actividad tripanocida de derivados de compuestos naturales</b>	199
<b>3. Evaluación de ligandos de G-Quadruplex como nuevos agentes tripanocidas</b>	206
<b>CONCLUSIONES</b>	213
<b>BIBLIOGRAFÍA Y ANEXOS</b>	219

# ÍNDICE DE FIGURAS

---

Figura 1. Distribución mundial de leishmaniasis	4
Figura 2. William Leishman y Charles Donovan	5
Figura 3. <i>Phlebotomus ariasi</i> y <i>Phlebotomus perniciosus</i>	9
Figura 4. Promastigotes procíclicos y promastigotes metacíclicos en <i>Leishmania spp.</i>	10
Figura 5. Ciclo de vida de <i>Leishmania spp.</i>	11
Figura 6. Niños con leishmaniasis visceral	14
Figura 7. Tipos de Leishmaniasis	16
Figura 8. Paciente con leishmaniasis dérmica posterior a Kala-Azar	17
Figura 9. Enfermos de kala-azar en el estado indio de Bihar	24
Figura 10. Distribución geográfica de la Enfermedad del Sueño	26
Figura 11. Gustavo Pittaluga Fattorini y Sir David Bruce	27
Figura 12. Número total de casos reportados de HAT	28
Figura 13. Mosca tsé-tsé	29
Figura 14. Ciclo de vida de <i>T. brucei</i>	31
Figura 15. Imagen representativa de <i>T. brucei</i> acumulándose en el tejido adiposo	32
Figura 16. Motilidad celular y endocitosis localizada en <i>T. brucei</i>	33
Figura 17. Capas antigénicas (VSG)	34
Figura 18. complejo ApoL1 Y factor de virulencia SRA	37
Figura 19. Biosíntesis de hemo en eucariotas y tripanosomátidos	45
Figura 20. Estructura química de transportadores ABC	47
Figura 21. Transportadores ABC mitocondriales	49
Figura 22. Biosíntesis de la maquinaria Fe/S en <i>T. brucei</i>	57
Figura 23. Tipos de Autofagia	59
Figura 24. Sistema de conjugación de ATG8	60
Figura 25. Modos de acción y blancos de los AMPs en tripanosomátidos	65
Figura 26. Representación esquemática del mecanismo para la función molecular de AS-48	68
Figura 27. Selección de clones a través del ácido 5-fluoroorótico (5-FOA)	96

Figura 28. Hidrólisis de X-gal a galactosa y mapa del vector pGEMT	106
Figura 29. Clonaje Gateway	107
Figura 30. Mapa del vector pENTR™D-TOPO	108
Figura 31. Descripción general del proceso de mutagénesis dirigida	110
Figura 32. Deleción de un alelo por recombinación	111
Figura 33. Ejemplo de la medida de la inflamación de una pata infectada en un modelo murino de leishmaniasis	119
Figura 34. Esquema de la cuantificación indirecta de hemo formado <i>de novo</i>	120
Figura 35. Esquema del ensayo tipo ELISA	127
Figura 36. Representación esquemática del ARNm de LmABCB3	134
Figura 37. El dominio UNE es exclusivo de <i>Leishmania</i> ABCB3	135
Figura 38. LmABCB3 contiene una Extensión Única N-terminal (UNE)	136
Figura 39. La representación esquemática de LmABCB3 y de la región UNE	137
Figura 40. Análisis filogenético de secuencias transportadoras ABCBs mitocondriales de mamíferos, levaduras, <i>Trypanosoma</i> y <i>Leishmania</i>	138
Figura 41. Western Blot de LmABCB3-GFP y LmABCB3_ΔUNE-GFP	139
Figura 42. Localización mitocondrial de LmABCB3	140
Figura 43. Representación esquemática de la dimerización de los ABC half-transporters	141
Figura 44. Alineamiento donde se confirma la mutación de LmABCB3	142
Figura 45. Generación de promastigotes de <i>L. major</i> con un alelo delecionado	143
Figura 46. Mapa de restricción en el locus de promastigotes wt y promastigotes <i>LmABCB3</i> <sup>+/-</sup>	144
Figura 47. Reducción de la expresión de <i>LmABCB3</i> en los parásitos <i>LmABCB3</i> <sup>+/-</sup>	144
Figura 48. Curva de Crecimiento de parásitos <i>LmABCB3</i> <sup>+/-</sup>	145
Figura 49. Infección de macrófagos THP1	146
Figura 50. Infección de promastigotes wt y <i>LmABCB3</i> <sup>+/-</sup> en un modelo murino de leishmaniasis cutánea	147
Figura 51. LmABCB3 es requerido para la biosíntesis de hemo mitocondrial.	148
Figura 52. Interacción de LmABCB3 con hemo	149
Figura 53. Complementación en medio sólido de LmABCB3 en ScΔATM1	151



Figura 54. Complementación en medio líquido de LmABCB3 en ScΔATM1	152
Figura 55. Conservación de residuos ScATM1 que interactúan con glutatión en LmABCB3	153
Figura 56. Homología estructural entre LmABCB3 y ScATM1	154
Figura 57. Bolsillo con carga positiva en LmABCB3	154
Figura 58. Modelo de homología de LmABCB3	155
Figura 59. Mutantes de LmABCB3 R483A, S589A, y M593A	156
Figura 60. Hipótesis nº1 del papel de LmABCB3 en el metabolismo de hemo	159
Figura 61. Hipótesis nº2 del papel de LmABCB3 en el metabolismo de hemo	160
Figura 62. Localización subcelular de LmUNECysless-mCherry	163
Figura 63. Inhibición de la proliferación <i>T. brucei</i> por AS-48	169
Figura 64. Efecto citocida de AS-48 en BSF de <i>T. brucei</i>	170
Figura 65. Control de la muerte celular mediante microscopía	172
Figura 66. Entrada de AS-48-FITC por <i>T. Brucei</i> BSF	173
Figura 67. Internalización de AS-48 a través de endocitosis dependiente de clatrina	174
Figura 68. Interacción de AS-48-FITC con <i>T. Brucei</i>	175
Figura 69. Interacción de AS-48 con VSG	176
Figura 70. Alteraciones ultra estructurales en <i>T. Brucei</i> causadas por AS-48 (TEM)	177
Figura 71. Autofagosomas en <i>T.brucei</i> tras el tratamiento con AS-48	179
Figura 72. Estructura de la sitamaquina (SQ)	190
Figura 73. Estructura de la tafenoquina (TFQ)	191
Figura 74. Ensayo de viabilidad celular de SQ y TFQ frente a <i>Trypanosoma brucei</i>	193
Figura 75. Microscopía óptica de parásitos tratados con sitamaquina	193
Figura 76. Espectro de excitación/emisión de la SQ y localización intracelular	194
Figura 77. Efectos ultra estructurales de la SQ en células BSF observadas por TEM	194
Figura 78. Efectos de la TFQ sobre la morfología de parásitos BSF observadas por SEM	195
Figura 79. Efectos ultra estructurales de la TFQ en células BSF observadas por TEM	196
Figura 80. Reversión de la resistencia a miltefosina por SQ	197
Figura 81. Estructuras químicas de la curcumina, resveratrol, tirosol, hidroxitirosol, quercetina y ácido gálico	201
Figura 82. Dúplex y cuádruplex de ADN	205

Figura 83. Ejemplo de ligando tipo	206
Figura 84. Localización celular en <i>T. brucei</i> de G4-6 y G4-7	208
Figura 85. Imágenes confocales de <i>T. brucei</i> tras la incubación con G4-9	209

## ÍNDICE DE TABLAS

---

Tabla 1. Especies del subgénero <i>Leishmania</i> (Viejo Mundo) y <i>Viannia</i> (Nuevo Mundo)	8
Tabla 2. Fármacos leishmanicidas actuales y sus principales características	20
Tabla 3. Tratamiento estándar para la tripanosomiasis africana humana según cepa y etapa	39
Tabla 4. Oligonucleótidos empleados para expresión en levaduras	89
Tabla 5. Oligonucleótidos empleados para expresión en <i>Leishmania major</i>	89
Tabla 6. Oligonucleótidos empleados para construcciones de parásitos KO <sup>±</sup> en <i>Leishmania</i>	90
Tabla 7. Oligonucleótidos empleados para la validación mediante PCR de parásitos KO <sup>±</sup> en <i>Leishmania</i>	91
Tabla 8. Oligonucleótidos empleados para la validación mediante Southern Blot de parásitos KO <sup>±</sup> en <i>Leishmania</i>	91
Tabla 9. Oligonucleótidos empleados para mutagénesis dirigida	92
Tabla 10. Oligonucleótidos empleados para qRT-PCR	93
Tabla 11. Oligonucleótidos empleados para generar la línea EGFP-ATG8.2 para la determinación de la autofagia en <i>Trypanosoma brucei</i>	94
Tabla 12. Solución de transformación de levaduras	97
Tabla 13. Protocolo de síntesis del ADN complementario utilizando como molde ARN	112
Tabla 14. Homología entre diferentes transportadores mitocondriales ABCB	138
Tabla 15. Actividad AS-48 en las subespecies de <i>T. brucei</i> causantes de HAT y nagana	170
Tabla 16. Las concentraciones tripanocidas de AS-48 no permeabilizan la membrana plasmática del parásito	171
Tabla 17. Actividades tripanocidas de los derivados de la quercetina (Q), la curcumina (C), El resveratrol (R) y el ac. gálico (AG)	202
Tabla 18. Actividades tripanocidas de los derivados del tirosol y el hidroxitirosol	203
Tabla 19. Actividades tripanocidas de los ligandos G4	207
Tabla 20. Actividades tripanocidas de los otros ligandos G4	209

# ABREVIATURAS

<b>ABC</b>	ATP-Binding Cassette	<b>ESAG</b>	Expression site associated genes
<b>ABTS</b>	Sal de diamonio de 2,2'-azino-di- (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)	<b>FAO</b>	Fondo Alimentario Mundial
<b>ADNc</b>	ADN complementario	<b>FBS</b>	Fetal bovine serum
<b>ALA</b>	ácido $\delta$ -aminolevulínico	<b>FECH</b>	Ferroquelatasa
<b>AMC</b>	Autofagia mediada por chaperonas	<b>FITC</b>	Isotiocianato de fluoresceína
<b>AMPs</b>	Péptidos Antimicrobianos	<b>FLVCR</b>	Feline Leukemia Virus Subgroup C Receptor
<b>APOL1</b>	Apolipoproteína A1	<b>FOA</b>	5-Fluoroorotic acid
<b>AQP1</b>	Acuaglicerporina 1	<b>G4</b>	Estructuras secundarias G-quadruplex
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico	<b>GA418</b>	Geneticina
<b>ARNg</b>	ARN guía	<b>GFP</b>	Green Fluorescent Protein
<b>ARNm</b>	ARN mensajero	<b>GP63</b>	Glicoproteína de Superficie
<b>ATF</b>	Adipose Tissue Forms	<b>GPI</b>	Glicosilfosfatidilinositol
<b>ATG</b>	Genes relacionados con Autofagia	<b>GSH</b>	Glutation
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato	<b>HAT</b>	<i>Human African Trypanosomiasis</i>
<b>AVAD</b>	Años de vida ajustados por discapacidad	<b>Hb</b>	Hemoglobina
<b>BES</b>	Bloodstream Expression Site	<b>HDL</b>	<i>High Density Lipoprotein</i>
<b>BCIP</b>	5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato	<b>HMB</b>	Hidroximetilbilano
<b>BCRP</b>	Breast Cancer Resistant Protein	<b>HMBS</b>	Hidroximetilbilano sintetasa
<b>BSA</b>	Bovine Serum Albumin	<b>Hp</b>	Haptoglobina
<b>BSF</b>	Bloodstream Forms	<b>Hp-Hb</b>	Complejo haptoglobina-hemoglobina
<b>CIA</b>	Maquinaria de ensamblaje ISC citosólico	<b>Hpr</b>	Proteína relacionada con la haptoglobina
<b>CLH</b>	Clatrina	<b>Hpr-Hb</b>	Complejo proteína relacionada con la haptoglobina-hemoglobina
<b>CMH</b>	Complejo Mayor de Histocompatibilidad	<b>HRP</b>	peroxidasa de rábano picante
<b>CPOX</b>	Coproporfirinógeno oxidasa	<b>HTS</b>	<i>High Throughput Screening</i>
<b>CRISPR</b>	Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats	<b>HYT</b>	Hydrositrosol
<b>°C</b>	Grados centígrados	<b>IL</b>	Interleucina
<b>DALY</b>	Disability-Adjusted Life Year	<b>IC50</b>	Concentración inhibitoria del 50 % de crecimiento
<b>DAPI</b>	4',6-diamidina-2-fenilindol dihidrocloro	<b>Ig G</b>	Inmunoglobulina G
<b>DDM</b>	Dodecilmaltósido	<b>Ig M</b>	Inmunoglobulina M
<b>DHA</b>	Dihidroxiacetona	<b>IPTG</b>	Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranósido
<b>DIC</b>	Contraste diferencial	<b>ISC</b>	Iron-Sulfur Clusters
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido	<b>kb</b>	Kilobase
<b>DNDi</b>	por sus siglas en inglés, Drugs for Neglected Diseases Initiative	<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>dNTPs</b>	Desoxinucleótidos trifosfato	<b>Lan</b>	Grupo sanguíneo Langereis
<b>DO</b>	Densidad óptica	<b>LB</b>	Medio de cultivo de bacterias Luria-Bertani
<b>DTT</b>	Ditiotreitol	<b>LCDA</b>	Leishmaniasis Cutánea Difusa Anérgica
<b>EDO</b>	Enfermedad de Declaración Obligatoria	<b>LCL</b>	Leishmaniasis Cutánea Localizada
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético	<b>LD</b>	Leishmaniasis Diseminada

<b>LDPK</b>	Leishmaniasis Dérmica Posterior a Kala-Azar	<b>ROS</b>	Reactive oxygen species
<b>LMM</b>	Leishmaniasis Mucocutánea	<b>RT-PCR</b>	PCR acoplada a una reacción de transcripción inversa
<b>LPG</b>	Lipofosfoglicano	<b>SC</b>	Synthetic complete
<b>LR</b>	Leishmaniasis Recidiva	<b>SDS</b>	Dodecil sulfato sódico
<b>LV</b>	Leishmaniasis Visceral	<b>SDS-</b>	Electroforesis desnaturalizante
<b>M</b>	Molar	<b>PAGE</b>	en gel de poliacrilamida
<b>Min</b>	Minutos	<b>SEM</b>	Scanning Electron Microscopy
<b>mL</b>	Mililitros	<b>SIF</b>	Stumpy Induction Factor
<b>MT</b>	de, Miltefosine Transporter	<b>SKO</b>	Single Knockout
<b>MTT</b>	Bromuro de 3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio	<b>SQ</b>	Sitamaquina
<b>NBD</b>	Dominio de unión a nucleótidos	<b>SRA</b>	Serum Resistance Associated
<b>NECT</b>	Nifurtimox-Eflornithine Combination Therapy	<b>SSC</b>	Tampón Salino Citrato Sódico
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud	<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Factor de Necrosis Tumoral alfa
<b>ORF</b>	del inglés Open Reading Frame	<b>T(SH)2</b>	Tripanotión
<b>OUA</b>	Organización de Estados Africanos	<b>TAE</b>	Tampón Tris-Acetato-EDTA
<b>PATTEC</b>	Campaña Panafricana de Erradicación de la mosca tse-tsé y la Tripanosomiasis	<b>TBE</b>	Tampón Tris-Borato-EDTA
<b>p/v</b>	Peso/volumen	<b>TbHpHbR</b>	Receptor de <i>Trypanosoma brucei</i> para el complejo haptoglobina-hemoglobina
<b>PAS</b>	Pre-Autophagosomal	<b>TE</b>	Tampón Tris-EDTA
<b>pb</b>	Pares de bases	<b>TEM</b>	Transmission electron microscopy
<b>PBS</b>	Phosphate Buffered Saline	<b>TFQ</b>	Tafenoquina
<b>PCF</b>	Procyclic Forms	<b>TLF</b>	Factor Tripanolítico
<b>PCR</b>	del inglés Polymerase Chase Reaction	<b>TMD</b>	Dominios Transmembrana
<b>PE</b>	Fosfatidiletanolamina	<b>TryS</b>	Tripanotión Sintetasa
<b>Pgp</b>	Glicoproteína de permeabilidad	<b>TYR</b>	Tirosol
<b>PI</b>	Punto Isoeléctrico	<b>UNE</b>	Unique N-terminal Extension
<b>PMA</b>	Acetato de forbolmiristato	<b>UROD</b>	Uroporfirinógenodescarboxilasa
<b>PMSF</b>	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo	<b>UROS</b>	Uroporfirinógeno sintetasa
<b>polyP</b>	Polifosfato inorgánico	<b>VIH</b>	virus de la inmunodeficiencia humana
<b>PPGIX</b>	protoporfirinógeno IX	<b>VHS</b>	Virus del herpes simple
<b>PPIX</b>	Protoporfirina IX	<b>VIP</b>	Péptido intestinal vasoactivo o vasoactive intestinal peptide
<b>PVDF</b>	Polifluoruro de vinilideno	<b>vPBS</b>	PBS modificado de Voorheisv
<b>qRT-PCR</b>	PCR para la cuantificación de la expresión génica relativa	<b>VSG</b>	Variant Surface Glycoprotein
<b>RENAVE</b>	Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica	<b>Wt</b>	Wild type
<b>RIT-seq</b>	RNA interference target-sequencing	<b>X-gal</b>	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranósido
		<b>YPD/YPG</b>	Extracto de levaduras peptona dextrosa o <i>Yeast extract Peptone Dextrose</i>





---

# INTRODUCCIÓN

---





## 1. Enfermedades causadas por parásitos tripanosomátidos

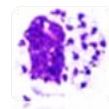
---

Los tripanosomátidos son un grupo de parásitos protozoarios patógenos, pertenecientes a la familia *Trypanosomatidae*, de gran importancia médica y veterinaria. Entre ellos, se encuentran: *Leishmania* spp., causante la leishmaniasis en regiones tropicales y subtropicales, *Trypanosoma brucei*, agente causal de la enfermedad del sueño en los humanos y del nagana en animales dentro del continente africano y *Trypanosoma cruzi*, responsable de la tripanosomiasis americana o Mal de Chagas en América central y Sudamérica<sup>1</sup>. Sus ciclos de vida son bastante complejos, incluyendo cambios morfológicos entre los estadios dentro del insecto vector y en el hospedador vertebrado.

### 1.1 Leishmaniasis

#### 1.1.1 Generalidades

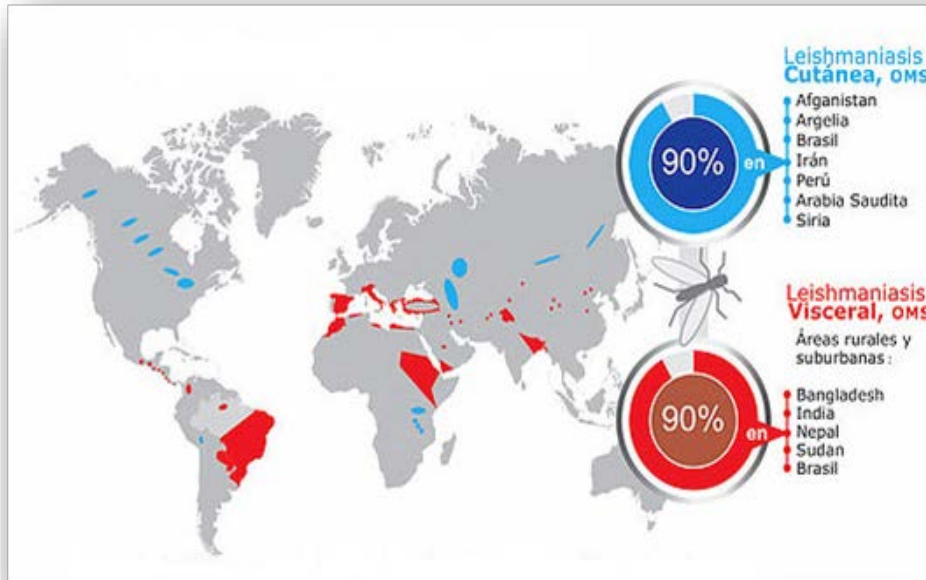
La leishmaniasis abarca un conjunto de enfermedades, con una amplia diversidad clínica y epidemiológica, causada por diferentes especies de parásitos protozoarios intracelulares del género *Leishmania*<sup>1</sup>.



De acuerdo con datos de la OMS (Organización Mundial de la Salud) y de la DNDi (por sus siglas en inglés, Drugs for Neglected Diseases Initiative)<sup>2</sup>, se estima que existe una incidencia total de aproximadamente 12 millones de casos de leishmaniasis en todo el mundo y que alrededor de 350 millones de personas habitan en zonas de riesgo de contraer la enfermedad. Cada año, se calcula que hay 1,3 millones de nuevos casos, 30-40.000 muertes y 1.974.000 de AVAD o DALY (Años de vida perdidos debido a enfermedad, discapacidad o muerte prematura)<sup>3</sup>. Pero, teniendo en cuenta que las tasas de registro son insuficientes ya que sólo las dos terceras partes de los países afectados registran estos datos, podríamos decir que las verdaderas tasas de incidencia de leishmaniasis pueden ser sustancialmente mayores.

La distribución geográfica de la leishmaniasis está relacionada con la distribución del vector, sensible a climas fríos, constituyendo un importante problema de salud pública en regiones tropicales y subtropicales.

En los últimos años se han registrado casos de transmisión endémica en un total de 98 países, distribuidos entre América, Europa, Asia y África, encontrándose la mayoría de estos países en vías de desarrollo<sup>3</sup>.



**Figura 1. Distribución mundial de leishmaniasis, OMS.**

Esta enfermedad, que afecta a las poblaciones más pobres del planeta, está asociada a la malnutrición, los desplazamientos de población, las malas condiciones de vivienda, la debilidad del sistema inmunitario y la falta de recursos. De tal forma que el 90% de los casos ocurre en seis países del Viejo Mundo (Afganistán, Argelia, Arabia Saudí, Irán, Sudán y Siria) y dos países del Nuevo Mundo (Brasil y Perú)<sup>4</sup>.

A pesar de que la enfermedad se concentra de forma mayoritaria en estos países dentro del sudeste asiático, este de África y Latinoamérica, también es endémica en distintos países de la cuenca mediterránea<sup>1</sup> (figura 1).

De hecho, estudios epidemiológicos recientes han demostrado un aumento de la prevalencia de leishmaniasis en Europa causada en gran medida por un aumento en los viajes internacionales, la dificultad para erradicar la infección en pacientes con SIDA, el uso de medicamentos inmunosupresores y la inmigración laboral<sup>5</sup>. Especialmente, en países o regiones no endémicas como Austria, Alemania,

Países Bajos y Reino Unido, se ha registrado un aumento de leishmaniasis importada<sup>6</sup>.

La leishmaniasis tiene una larga historia, con varias descripciones primitivas de la enfermedad que se han encontrado en escritos antiguos que datan de 2.500 a.C.<sup>7</sup> Desde que en 1905 Píanesse identificara en Nápoles, en niños afectados de “anemias esplénicas”, un parásito morfológicamente similar a los descritos en 1903 por Leishman y Donovan en enfermos de kala-azar, existía la sospecha de que también en nuestro país existía esta parasitosis (figura 2).



**Figura 2. William Leishman y Charles Donovan.** La leishmaniasis se conoció después de que William Leishman (izda), un médico que trabajaba para el ejército británico en la India, descubriera cuerpos ovoides en el bazo de un soldado británico que estaba experimentando episodios de fiebre, anemia, atrofia muscular e hinchazón del bazo. Leishman describió esta enfermedad como "fiebre dum dum" y publicó sus hallazgos en 1903. Charles Donovan (dcha) también reconoció estos síntomas en otros pacientes de kala-azar y publicó su descubrimiento unas semanas después de Leishman.

Esta expectativa se confirmó cuando en el verano de 1912 Pittaluga diagnosticó en Tarragona el primer caso español de kala-azar al visualizar leishmanias en una muestra obtenida por punción esplénica de un enfermo sospechoso. Un año más tarde y en esta misma zona se descubrió el primer caso de leishmaniosis canina. En 1914, casi simultáneamente, Camacho Alexandre y Fernández Martínez describieron en la costa occidental de Andalucía los primeros casos de botón de Oriente (leishmaniasis cutánea). Poco a poco se fue comprobando

que éstas eran enfermedades relativamente frecuentes, que afectaban extensas áreas de nuestro país<sup>8</sup>.

La enfermedad suele ser una zoonosis<sup>9</sup> aunque hay regiones donde se transmite humano-humano (antroponosis). Esto ocurre por ejemplo en la India, donde el principal reservorio del parásito es el hombre<sup>10</sup>. Aunque el perro es el principal reservorio doméstico de estos parásitos, hay además una gran diversidad de animales que pueden ser considerados como reservorios, y que a diferencia del perro (donde la infección comparte muchos rasgos clínico-patológicos con la enfermedad humana) son los portadores asintomáticos. Los gatos domésticos podrían ser hospedadores reservorios secundarios en el sur de Europa, y las infecciones pueden estar asociadas con retrovirus felinos<sup>11</sup>; Por otra parte, se encuentra la lebre, que fue precisamente el reservorio responsable del brote de leishmaniasis que afectó a la provincia de Madrid en 2009<sup>12</sup>. Recientes estudios, sugieren que la progresión de la leishmaniasis visceral está fuertemente asociada con la deficiencia de vitamina D en perros, ya que la ruta de la vitamina D podría estar implicada en la respuesta inmunitaria frente *Leishmania* y esto podría afectar la susceptibilidad de sufrir la enfermedad<sup>13</sup>.

En España, el agente etiológico de la leishmaniasis es principalmente *Leishmania infantum*<sup>14</sup>, el cual, puede ser transmitido por dos especies de flebotomos: *Phlebotomus perniciosus* y *Phlebotomus ariasi*. Se trata de una zoonosis hipoendémica presente en prácticamente todo el territorio peninsular y en las Islas Baleares, con distribución focal. Se estima que el 7% de la población canina está infectada, aunque existen regiones, como ocurre en Andalucía, donde se llega hasta un 35%. Cabe indicar que la transmisión que predomina en nuestro país es urbana y periurbana más que rural<sup>15</sup>.

En 2009, se produjo un brote de leishmaniasis humana en el área urbana del suroeste de Madrid, notificándose 494 casos desde julio de 2009 hasta enero de 2014 según los datos suministrados por la Consejería de Sanidad de la Comunidad de Madrid, convirtiéndose éste en el mayor brote de leishmaniasis provocado por *Leishmania infantum* reportado en Europa. Del total de los casos, 182 correspondían a leishmaniasis visceral (36'8%) y 312 a leishmaniasis cutánea (63'2%). Diferentes estudios han confirmado que *P. perniciosus* es el único vector en el área afectada, con

altas densidades y tasas de infección, siendo los conejos y las liebres los principales reservorios transmisores de la enfermedad. Actualmente el brote está controlado, sin embargo, la amenaza sigue latente y no se descartan ciertos repuntes, por lo que se hace necesaria una vigilancia extensa y permanente en esta región, para controlar el vector y regular las poblaciones de reservorios silvestres.

Durante la última década, la prevalencia de la enfermedad se ha quintuplicado en algunas partes del sur de Europa, donde se estima que 2,5 millones de perros están infectados. Este aumento se debe principalmente a una expansión en la distribución del flebotomo como consecuencia del cambio climático y del mayor número de perros que viajan entre los países europeos<sup>16</sup>.

La Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE), la considera como una Enfermedad de Declaración Obligatoria (EDO) en aquellas Comunidades Autónomas en las que la enfermedad se considera endémica, siendo así en la mayor parte del territorio peninsular y en las Islas Baleares<sup>15</sup>.

Entre las enfermedades parasitarias, la mortalidad por leishmaniasis es sólo superada por la malaria<sup>17</sup>, y, en términos de años de vida ajustados por discapacidad (AVAD), es la tercera causa más común de morbilidad después de la malaria y la esquistosomiasis, siendo los niños menores de 15 años de edad los que sufren la mayoría de las cargas de la enfermedad<sup>1</sup>. Además, la coinfección con VIH, tanto para la leishmaniasis cutánea como para la leishmaniasis visceral, empeora significativamente el pronóstico para ambas infecciones<sup>18</sup>.



### **1.1.2 Agente etiológico**

*Leishmania* es un género de parásitos protozoarios intracelulares y monoflagelados pertenecientes a la clase *Kinetoplastida*, familia *Trypanosomatidae*. De este género, se han descrito aproximadamente 53 especies, de las cuales 31 son parásitos de mamíferos y 20 son patógenas para los seres humanos<sup>7</sup>. Aunque morfológicamente las diferentes especies son indistinguibles, e incluso el estatuto taxonómico de muchas de ellas está en debate<sup>19</sup>, se ha obtenido una clasificación más clara mediante análisis de isoenzimas, métodos moleculares, o con anticuerpos monoclonales<sup>20</sup> (tabla 1).

**Tabla 1.** Especies del subgénero *Leishmania* (Viejo Mundo) y *Viannia* (Nuevo Mundo)<sup>21</sup>.

Subgénero <i>Leishmania</i>		Subgénero <i>Viannia</i>	
<i>L. donovani</i>	<i>L. donovani</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. Braziliensis</i>
	<i>L. archibaldi</i>		<i>L. Peruviana</i>
	<i>L. infantum</i>		
	<i>L. chagasi</i>		
<i>L. tropica</i>	<i>L. tropica</i>	<i>L. guyanensis</i>	<i>L. Guyanensis</i>
	<i>L. killicki</i>		
	<i>L. aethiopica</i>		<i>L. Panamensis</i>
	<i>L. mayor</i>		
<i>L. mayor</i>	<i>L. gerbilli</i>	<i>L. lainsoni</i>	<i>L. Shawi</i>
	<i>L. arabica</i>		<i>L. lainsoni</i>
	<i>L. turanica</i>		
	<i>L. mexicana</i>		
<i>L. mexicana</i>	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. lainsoni</i>	<i>L. naiffi</i>
	<i>L. venezuelensis</i>		
	<i>L. pifanoi</i>		<i>L. lindenbergi</i>
	<i>L. ganhami</i>		
	<i>L. aristidesi</i>		<i>L. utingensis</i>
	<i>L. forattinii</i>		

La transmisión de un hospedador vertebrado a otro se realiza por la intervención de hembras hematófagas de pequeños dípteros que pertenecen a la familia *Psychodidae* y subfamilia *Phlebotominae*.

Hasta la fecha, se ha estimado que existen más de 800 especies de estos insectos en diferentes regiones del mundo, clasificándose en el suborden *Nematocera*, orden *Diptera*, familia *Psychodidae* y subfamilia *Phlebotominae*<sup>7</sup>. Entre estas especies, sólo 34 juegan un papel importante en la transmisión de *Leishmania*<sup>22</sup>. En España se han identificado 11 especies de flebótomos<sup>23</sup>, siendo únicamente *Phlebotomus perniciosus* y *Phlebotomus ariasi* las capacitadas para la transmisión de *L. infantum*<sup>15</sup>.



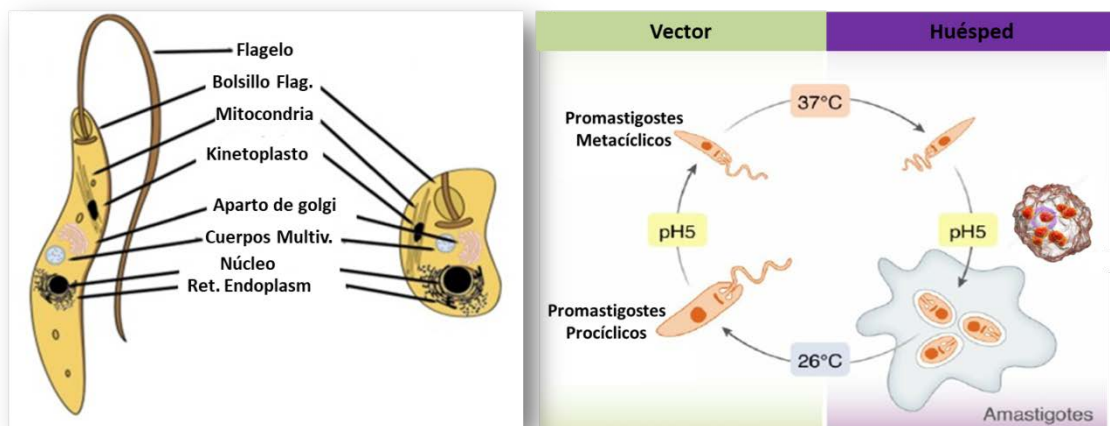
Figura 3. *Phlebotomus ariasi* (dcha) y *Phlebotomus perniciosus* (izda).

### 1.1.3 Ciclo de vida

La mayoría de las especies de *Leishmania* presentan dos etapas de desarrollo: una forma promastigote extracelular que tiene lugar en el tracto intestinal del flebotomo, y una forma amastigote intracelular que se diferencia y se multiplica en huésped mamífero, causando las patologías de la leishmaniasis<sup>24</sup>. Esto quiere decir que durante su ciclo de vida, *Leishmania* está expuesta a muy diferentes condiciones físicas y químicas que supera debido a su gran capacidad de adaptación y a la activación de respuestas fisiológicas que garantizan su supervivencia.

Los **promastigotes** son fusiformes; sus medidas varían de 10 a 20  $\mu\text{m}$  de largo x 1,5 a 3,0  $\mu\text{m}$  ancho, dependiendo de la etapa de diferenciación, procíclica o inmadura, y metacíclica o infectiva en la que se encuentren. Son flagelados, tienen núcleo central y citoplasma granulado. La superficie celular está cubierta de lipofosfoglicanos. Presentan un kinetoplasto (estructura mitocondrial especializada que contiene ADN) cercano al bolsillo flagelar. Se alojan en el tubo digestivo del insecto vector y es el estadio en el que los cultivos puede mantenerse *in vitro*. Los **amastigotes** de forma ovoide o esférica se alojan en el fagolisosoma (pH ácido) de las células del sistema reticuloendotelial del hospedero (macrófagos). Miden de 2,0 a 6,0  $\mu\text{m}$  de largo y 1,5 a 3,0  $\mu\text{m}$  de ancho. Su núcleo es redondo y excéntrico, la mitocondria es rudimentaria y sus septos se continúan con el kinetoplasto en forma de bastón (figura 4)<sup>25</sup>.



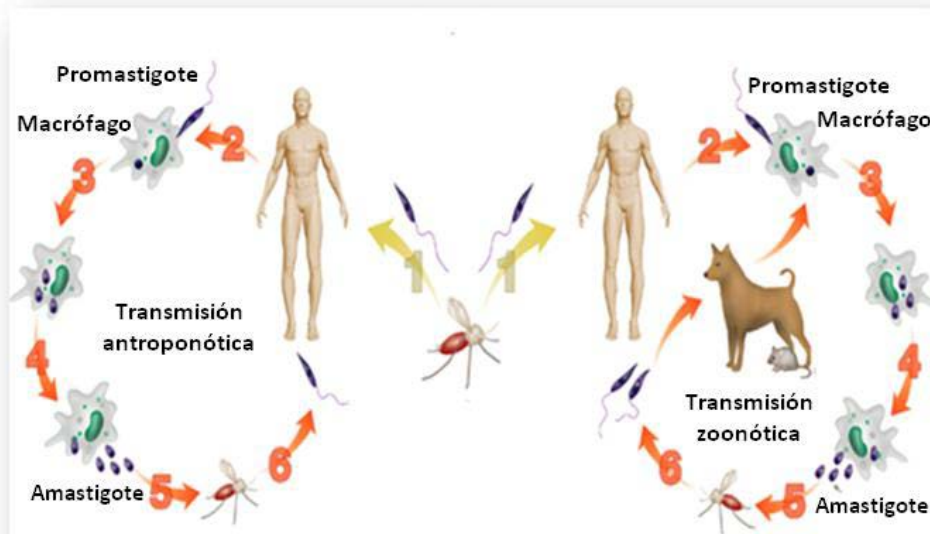


**Figura 4.** Los promastigotes procíclicos se diferencian en la forma promastigote metacíclica virulenta en respuesta a la acidificación ambiental.

En estos hospederos, el parásito debe ser capaz de adaptarse a vivir en tres microambientes diferentes: 1) en el tracto digestivo del insecto vector; 2) en el compartimiento extracelular de los hospederos mamíferos una vez que el promastigote es inoculado por el insecto vector, y 3) en los fagolisosomas de los macrófagos. Durante el desarrollo del parásito en el tracto digestivo del vector se han descrito varias formas morfológicas. Estos cambios morfológicos están asociados con cambios genéticos y bioquímicos que modulan funciones biológicas del desarrollo del parásito. En el vector, estos cambios conllevan la transformación de promastigotes no infectivos o poco infectivos (procíclicos) a promastigotes infectivos (metacíclicos) y que les permitirá sobrevivir en un nuevo ambiente dentro del hospedador mamífero. Este proceso se conoce como **metaciclologénesis**<sup>26</sup>.

El ciclo de desarrollo se inicia cuando las hembras de los flebotomos durante la ingesta de sangre, que realizan para alimentarse y poder desarrollar sus huevos, inoculan en la piel de un hospedero vertebrado los parásitos en el estadio de promastigotes metacíclicos, que son altamente infectivos.





**Figura 5. Ciclo de vida de *Leishmania* spp.** Las formas promastigotes penetran en la piel tras la picadura de un flebotomo hembra durante su ingesta de sangre (1) y luego son fagocitados por los macrófagos del huésped (2). Los promastigotes se convierten a la forma amastigote no flagelada dentro de los macrófagos (3), se dividen por fisión binaria (4) y finalmente son liberados por la ruptura de los macrófagos (5). Pueden ser absorbidos por un flebotomo durante otra ingesta de sangre. La forma amastigote se convierte en promastigote en el tracto digestivo del flebotomo y puede transmitirse nuevamente a otro ser humano (transmisión antroponótica) o a animales que actúan como reservorios (transmisión zoonótica) (6) cerrándose así el ciclo<sup>27</sup>.

Tras la picadura del insecto vector, se origina una movilización rápida y numerosa de neutrófilos hacia el lugar de la inoculación<sup>28</sup>, produciéndose la ingestión y destrucción de la mayoría de los parásitos<sup>29</sup>. Sin embargo, algunos pueden sobrevivir en su interior de manera transitoria, evitando la generación de ROS, dirigiéndose a los compartimentos no líticos del neutrófilo y multiplicándose por división binaria<sup>39</sup>. La replicación ocurre en cantidades que oscilan desde decenas hasta cientos. Las células infectadas se rompen finalmente y los amastigotes se diseminan a través del organismo infectando nuevas áreas de acuerdo a factores del parásito y del hospedero. Cuando flebotomos libres de infección se alimentan de individuos infectados, ingieren las células con amastigotes que sufren cambios bioquímicos y morfológicos en el intestino medio del insecto, se multiplican y finalmente migran a la probóscide como promastigotes metacíclicos, reiniciándose el ciclo (figura 5).

Al igual que la mayoría de vectores hematófagos, a lo largo de su vida los flebotomos se alimentan en múltiples ocasiones con sangre lo que aumenta su capacidad para transmitir enfermedades.

#### **1.1.4 Relación parásito-vector**

La interacción *Leishmania*-vector es un proceso complejo y multifactorial. Las diferentes especies de *Leishmania* poseen la capacidad de expresar y/o secretar proteínas determinantes para el establecimiento y sobrevivencia del parásito en el sistema digestivo del insecto<sup>30</sup>. Estas moléculas, actúan como factores de virulencia y entre ellas pueden destacarse el **lipofosfoglicano (LPG)**<sup>31</sup> y la **glicoproteína de superficie gp63**<sup>32</sup>.

En el tracto digestivo del vector, los promastigotes procíclicos permanecen adheridos al epitelio intestinal mediante la unión del LPG con galectinas del insecto. LPG y gp63 protegen además a los promastigotes de la acción de enzimas hidrolíticas. Durante el proceso de metaciclologénesis, las moléculas de LPG experimentan modificaciones tales como la elongación de su estructura y cambios en su composición, reduciendo de esta manera su afinidad por las galectinas. Esto permite a los promastigotes metacíclicos migrar hacia la faringe del insecto como paso previo a su inoculación al hospedador vertebrado<sup>33</sup>.

#### **1.1.5 Establecimiento de la infección**

Tras producirse la inoculación del parásito por la picadura del vector, se desarrolla un proceso inflamatorio local. La saliva de los flebotominos contiene sustancias con actividad anticoagulante, inmunosupresora y vasodilatadora como el maxadilán (género *Lutzomyia*) o la adenosina (género *Phlebotomus*), favoreciendo la sobrevivencia y desarrollo de los promastigotes metacíclicos infectivos en el hospedador vertebrado. Distintos estudios han demostrado que la inoculación de los parásitos produce respuestas diferentes en función de si va acompañada o no de la saliva del flebotomo, de tal forma que puede modular la respuesta inmune<sup>35</sup>. Además de la saliva, recientemente se ha demostrado la importancia de la microbiota intestinal del flebotomo en el establecimiento de la infección. Diferentes estudios han puesto de manifiesto que las bacterias intestinales de los flebotomos permanecen en la piel del huésped junto con los parásitos tras la

picadura del insecto. Estas bacterias desencadenan una respuesta inflamatoria que da lugar a una producción rápida de interleucina-1b (IL-1b), que mantiene la infiltración de neutrófilos. La persistencia de neutrófilos en la zona de la picadura protege a los parásitos reclutados y esto mejora el establecimiento de la infección y por lo tanto, de la enfermedad. Se ha visto que la reducción mediante el uso de antibioticos de la microbiota del intestino medio de los flebotomos infectados con *Leishmania* o la neutralización del efecto de la IL-1b en ratones con picaduras, anula el reclutamiento de neutrófilos<sup>36</sup>.

Además de a neutrófilos, la respuesta inflamatoria inducida por la picadura del vector y la inoculación del parásito atrae a otras células fagocíticas (macrófagos y células de Langerhans) que actúan como células presentadoras de antígenos a los linfocitos T, necesarios para iniciar la modulación de la respuesta inmune de tipo celular<sup>37</sup>. Ambos tipos celulares, participan en el proceso inflamatorio al expresar moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad Clase II (CMH) y moléculas de adhesión que son necesarias para la migración y retención de las células inflamatorias<sup>38</sup>. En el sitio de la infección, los macrófagos tisulares activados secretan abundantes citoquinas mediadoras de inflamación, incluyendo el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNFa), las interleuquinas (ILs) IL-1, IL-6 e IL-12, al igual que proteínas C3 del Complemento<sup>39</sup>.



Dentro del neutrófilo, los promastigotes no son capaces de crecer ni diferenciarse a amastigotes<sup>40</sup>. Los promastigotes deben transferirse desde los neutrófilos hasta los macrófagos, pero no está claro el modo en que esto sucede<sup>28</sup>. Se ha observado *in vitro* que los neutrófilos infectados se vuelven apoptóticos a los 2-4 días y exponen fosfatidilserina (PS) en su superficie, lo que facilita el reconocimiento por los macrófagos, que terminan fagocitándolos. Esta vía se denomina silenciosa o “Caballo de Troya”, ya que los parásitos transferidos al macrófago podrán replicarse libremente<sup>41</sup>.

### 1.1.6 Manifestaciones clínicas de la enfermedad

Además de la especie de *Leishmania*, la respuesta inmune del hospedador vertebrado así como el vector transmisor, juegan un papel clave en la presentación clínica de la enfermedad.

La **Leishmaniasis visceral (LV)**, también conocida como **kala-azar**, es una de las formas más virulentas de leishmaniasis con una mortalidad de hasta un 95% en ausencia de tratamiento. Se caracteriza por episodios irregulares de fiebre, pérdida de peso, hepato-esplenomegalia y anemia. Es altamente endémica en el subcontinente indio y África oriental. Se estima que cada año se producen en el mundo entre 50.000 y 90.000 nuevos casos de leishmaniasis visceral. En 2015, más del 90% de los nuevos casos notificados a la OMS se produjeron en siete países: Brasil, Etiopía, India, Kenya, Somalia, Sudán y Sudán del Sur<sup>19</sup>.



**Figura 6. Niños con leishmaniasis visceral - Sur de Etiopía.** Tomada de *Médicos Sin Fronteras*.

La forma más común de leishmaniasis es la **leishmaniasis cutánea localizada (LCL)**, también denominada como “botón de oriente”. En este tipo de leishmaniasis los parásitos permanecen localizados en los tejidos de la piel produciendo úlceras cutáneas crónicas de cicatrización lenta<sup>42</sup>. La lesión comienza como una pequeña zona de eritema en el lugar de la picadura que evoluciona a pápula y aumenta de tamaño (figura 7). Posteriormente, puede ulcerarse en el centro y presentar un borde sobreelevado, bien definido e hiperpigmentado. Las úlceras pueden ser secas o exudativas, estando las últimas sujetas a infección secundaria superficial por especies bacterianas o fúngicas y siendo las especies de

*Staphylococcus* las más comunes<sup>43</sup>. En otras ocasiones la lesión no se ulcera, pero puede desarrollar hiperqueratosis o evolucionar a una forma nodular<sup>44</sup>. En muchos casos, las lesiones son capaces de autocurarse sin ningún tratamiento, sin embargo, la resolución puede llevar varios meses e incluso años y da como resultado la formación de una cicatriz deprimida e hipopigmentada<sup>42</sup>.

La **leishmaniasis mucocutánea (LM)**, también conocida como “espundia”), ocurre años después del inicio de la leishmaniasis cutánea y se caracteriza por la destrucción de las cavidades oral-nasal y faríngea, que puede evolucionar a lesiones desfigurantes (figura 7). Los síntomas iniciales son leves, con inflamación nasal y congestión apareciendo la ulceración y la perforación del tabique lentamente. La lesión puede extenderse a la cara, el paladar blando, la faringe o la laringe y también puede ir acompañada de lesión cutánea. *L. (V.) braziliensis* está presente en la mayoría de los casos, pero también se encuentran otras especies como *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (L.) amazonensis* y *L. (L.) major*<sup>45</sup>.

La **leishmaniasis recidiva (LR)** es conocida en el Viejo Mundo por estar asociada con la infección por *L. (L.) tropica*, presentando una baja incidencia en el Nuevo Mundo. Las lesiones características (pápulas y vesículas) aparecen después de la curación clínica o alrededor de la úlcera cicatrizada después de un período variable que puede ir de meses a años<sup>45</sup>.



La **leishmaniasis diseminada (LD)**, también llamada leishmaniasis cutánea diseminada o LCD) se caracteriza por un elevado número de lesiones de tipo acneiforme, papular, nodular y ulcerado (figura 7). La rapidez y amplitud de la diseminación, así como la ausencia de agrandamiento de los ganglios linfáticos, sugieren la implicación del torrente sanguíneo en la propagación del parásito. Las lesiones de la mucosa nasal son similares a las producidas en LM y ocurren en hasta el 44% de los casos de LD. Aunque los pacientes suelen responder al tratamiento, pueden requerir la combinación de diferentes fármacos y ser ligeramente más largos que los tratamientos de LCL<sup>46</sup>.

La **leishmaniasis cutánea difusa anérgica (LCDA)**, también llamada leishmaniasis cutánea difusa o LCD) es una forma rara pero grave de LCL, que se caracteriza por el desarrollo de múltiples lesiones satélites que pueden fusionarse

dando como resultado placas que cubren grandes áreas de la piel (figura 7). Las lesiones son predominantemente de naturaleza nodular o papular, contienen una gran cantidad de amastigotes y no se ulceran<sup>45</sup>. Se cree que la falta de ulceración y el crecimiento descontrolado de amastigotes son consecuencia de una respuesta inmune celular anérgica.



**Figura 7. Tipos de Leishmaniasis.** Arriba (izda) niña con LCL o “botón de Oriente”; (dcha) niño con LMM o “espundia”. Abajo (dcha) paciente con LD; (izda) paciente con LCDA. Imágenes tomadas del libro Dermatología. Atlas, diagnóstico y tratamiento

La **leishmaniasis dérmica posterior a Kala-Azar (LDPK)** es una complicación de la leishmaniasis visceral causada por *L. (L.) donovani*, que se produce principalmente en el este de África (Sudán, Etiopía, Kenia) y el subcontinente indio (India, Bangladesh, Nepal)<sup>47</sup>. Hay numerosas presentaciones clínicas: en África se presenta más comúnmente como una colección de dermatosis que comprende una erupción macular, maculopapular o nodular; en la India se forman eritemas así como lesiones maculares y papulares que pueden fusionarse en placas. LDPK puede ocurrir concurrentemente con leishmaniasis visceral (LV) o después de la resolución de la infección visceral. Entre el 15-20% de casos de LDPK ocurre sin ningún síntoma previo de LV, lo que demuestra que por razones desconocidas, las infecciones asintomáticas pueden convertirse en LDPK<sup>48</sup>.

**Leishmaniasis tegumentaria en pacientes infectados por VIH.** La coinfección por VIH/leishmania ha sido documentada en 34 países tanto del Viejo

Mundo como del Nuevo Mundo. En los pacientes infectados por VIH, la leishmaniasis tegumentaria puede presentarse como un síndrome inflamatorio de reconstitución inmune (desarrollado tras el inicio del tratamiento antirretroviral y la recuperación de recuentos de células T CD4<sup>+</sup> y una disminución de las cargas virales<sup>45</sup>), con la aparición de nuevas lesiones diseminadas o un empeoramiento de las preexistentes.



**Figura 8. Paciente con leishmaniasis dérmica posterior a Kala-Azar.** Tomada de *Médicos Sin Fronteras*.

#### 1.1.7 Tratamiento farmacológico

Aunque la leishmaniasis tiene opciones de tratamiento, la terapia es problemática debido a la complejidad de la enfermedad. Las terapias disponibles para las diferentes formas de leishmaniasis están lejos de ser ideales principalmente por la elevada toxicidad, la falta de eficacia, la forma de administración (parenteral generalmente), los altos costos, la falta de acceso a tratamiento en determinadas áreas o el fallo terapéutico (debido esto último en muchos casos, a la emergente resistencia de los parásitos a los medicamentos). En muchas situaciones, la decisión de continuar con el tratamiento se basa en la gravedad de la enfermedad y la relación riesgo/beneficio<sup>49</sup>.

En la actualidad, el tratamiento farmacológico para controlar la leishmaniasis comprende sólo cinco fármacos. Estos incluyen **antimoniales pentavalentes**, **anfotericina B** y su formulación liposomal AmBisome, **miltefosina**, **paromomicina** y **pentamidina**. Excepto los compuestos antimoniales, el resto no son verdaderos leishmanicidas<sup>50</sup>.



La primera línea de medicamentos utilizados en el tratamiento de cualquier tipo de leishmaniasis son los **complejos de antimonio pentavalente**. En 1912, el médico Gaspar Vianna, tras observar el efecto del antimonio trivalente (tártaro emético) en ciertos tripanosomas, decidió utilizar este compuesto para el tratamiento de casos de leishmaniasis cutánea diagnosticados en São Paulo, Brasil. El desarrollo de antimoniales pentavalentes permitió una reducción en la toxicidad del tratamiento. Las formulaciones de los antimoniales pentavalentes disponibles comercialmente, estibogluconato de sodio (Pentostam®) y antimoniato de N-metil glucamina (Glucantime®), se han usado para el tratamiento de la leishmaniasis tegumentaria y la leishmaniasis visceral<sup>51</sup>. Estos compuestos actúan promoviendo el eflujo de tioles e inhibiendo la tripanotión reductasa y la glutatión sintetasa, lo que origina una acumulación de las formas oxidadas de tripanotión y de glutatión<sup>52</sup>. Su acción conduce a una depleción en los niveles de ATP, despolarización de la membrana mitocondrial y producción de ROS, lo que conduce al proceso de muerte celular similar a la apoptosis<sup>53</sup>.

Sin embargo, estos medicamentos tienen dos limitaciones principales: primero, los efectos secundarios son frecuentes y pueden ser fatales. En segundo lugar, la resistencia del parásito está emergiendo en algunas áreas endémicas, habiéndose descrito, por ejemplo, que hasta el 65% de los casos de leishmaniasis visceral en el estado de Bihar (India) son resistentes a Glucantime®<sup>54</sup>.

Los mecanismos de resistencia de los parásitos a los antimoniales pentavalentes son diversos. El principal está relacionado con la disminución de la concentración de fármaco en el interior del parásito. Esto es realizado de diferentes maneras: descenso en la incorporación mediada por la acuaglicerporina 1 (AQP1), sobreexpresión de ARM58,<sup>55,56</sup> aumento del secuestro y eflujo dependiente de tioles mediado por algunos transportadores ABC tales como MRPA/ABCC3, ABCI4 o ABCG2<sup>57,58</sup>, inhibición de la activación del fármaco o inactivación mediante metabolismo<sup>59</sup>. La sitamaquina, un fármaco leishmanicida que alcanzó la fase II en los ensayos clínicos cuyo desarrollo se detuvo por su baja eficacia<sup>60</sup>, puede revertir la resistencia al antimonio mediada por MRPA/ABCC3<sup>61</sup>.

La **anfotericina B**, es un antifúngico que se ha utilizado como tratamiento alternativo en la leishmaniasis pero tiene efectos secundarios graves. Este fármaco



se une al ergosterol (esterol predominante en las membranas de *Leishmania* spp.) de la membrana plásmica del parásito con alta afinidad, formando poros, aumentando la permeabilidad a iones y provocando la muerte del del parásito<sup>62</sup>. Actualmente, y aunque se desconoce el mecanismo por el cual se produce, se sabe que la anfotericina B es también capaz de generar estrés oxidativo. El mecanismo exacto por el cual la anfotericina B tiene este efecto es desconocido aunque se ha propuesto, que podría actuar como un agente prooxidante que generaría especies ROS<sup>63</sup>. La formulación liposomal de anfotericina B (AmBisome) hizo que el medicamento fuera menos tóxico y más eficaz, siendo a día de hoy la formulación más utilizada para el tratamiento de la leishmaniasis visceral. Su uso está autorizado para el tratamiento de esta forma de leishmaniasis en India, Estados Unidos y Europa y es usado como fármaco de segunda línea en África Oriental y Brasil<sup>64</sup>. Varios estudios han demostrado que la pérdida de ergosterol se asocia con resistencia a la anfotericina B. No obstante, la resistencia clínica a este fármaco es poco frecuente<sup>53</sup>.



**Tabla 2. Fármacos leishmanicidas actuales y sus principales características<sup>49</sup>.**

Fármaco	Enf/dosis	Adm.	Ef/vent	Res.	Tox.	Lim
<b>Estibogluconato de sodio</b>	LV (menos en Bihar), LC	IV, IM o IL	35-95% según área	>65% en Bihar, India	Toxicidad: -Cardíaca -Nefrótica -Pancreática -Hepática	• Resistencia en Bihar, India. • Incumplimiento de tratamiento (prolongado y administración dolorosa)
<b>Antimoniato de glucamina</b>	20 mg/kg/d durante 30 días		Disponible			
<b>Anfotericina B</b>	LV, LC 1 mg/kg/d durante 30 días	IV	>90%  Resistencia primaria no documentada	Cepas de lab	Nefrotoxicidad, tromboflebitis e hipocalcemia	• Hospitalización por infusión intravenosa lenta
<b>Anfotericina B liposomal (AmBisome)</b>	LV 3-5 mg/kg/d durante 20 días	IV	>96%  Baja toxicidad, resistencia no documentada	No hay datos	Nefrotoxicidad leve, escalofríos y fiebre durante la infusión	• Inestabilidad térmica • Alto costo
<b>Miltefosina</b>	LV 2-2.5 mg/kg/d durante 28 días	Oral	>94%  Trat. Oral	Cepas de lab	Hepatotoxicidad, nefrotoxicidad y teratogenicidad	• Larga vida media (resistencias emergente) • No puede administrarse a embarazadas
<b>Paromomicina</b>	LC, LMC 15 mg/kg/d durante 21 días	IM o uso tópico	Asia: >94%  África: 46-85%  Bajo coste	Cepas de lab	Ototoxicidad, nefrotoxicidad y hepatotoxicidad	• Eficacia varía según cepas de Leishmania  • Potencial de resistencia
<b>Pentamidina</b>	LV, LC 3 mg/kg/d durante 4 días	IM	36-96% según área  Régimen de dosificación corto	No hay datos	Hiperglucemia severa, hipotensión, miocarditis y taquicardia	• Eficacia varía según ubicación geográfica de la enfermedad

Enf (tipo de enfermedad), Adm (administración), Ef (eficacia), Vent (ventajas), Res (resistencias), Tox (toxicidad), Lim (limitaciones), , IV (intravenoso), IM (intramuscular), IL (intralinfática), LV (Leishmaniasis visceral), LC (Leishmaniasis cutánea), LMC (Leishmaniasis mucocutánea).

La **pentamidina**, un derivado sintético de la diamidina descubierta durante la búsqueda de fármacos hipoglucemiantes, se usa en casos de resistencia a antimoniales como una forma alternativa para el tratamiento de la leishmaniasis; sin embargo, sus efectos secundarios, entre los que se incluyen trastornos metabólicos (diabetes) y cardiotóxicos, sumado a su poca eficacia ya la aparición rápida de resistencias *in vitro* (se ha demostrado que la proteína PRP1/ABCC7 es responsable de la aparición de resistencias frente a la pentamidina<sup>65</sup>), han convertido a este fármaco en una opción deficiente para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea. El modo preciso de acción frente a *Leishmania* a fecha de hoy no está bien descrito, pero se sabe que inhibe el sistema de transporte activo<sup>66</sup>. También hay estudios que sugieren que este compuesto se acumula en la mitocondria del parásito, donde inhibe la topoisomerasa II mitocondrial y la biosíntesis de poliaminas, y altera el potencial de membrana mitocondrial<sup>67</sup>.

La **miltefosina**, una alquilfosfocolina, es el único fármaco leishmanicida que hoy en día se administra por vía oral. Se desarrolló inicialmente como un fármaco anticancerígeno y se utilizó en el tratamiento de la leishmaniasis visceral en la India, con tasas de curación en pacientes de aproximadamente el 94%. Sin embargo, después de una década de uso en el país, se han descrito varios casos de resistencia y disminución de la eficacia del tratamiento. A pesar de la ventaja de ser administrado por vía oral, tiene muchos efectos secundarios como la intolerancia gastrointestinal (vómitos, diarreas), toxicidad hepática y nefrotoxicidad ocasional<sup>68</sup>. El modo de acción exacto de la miltefosina no se conoce bien, aunque probablemente esté asociado a su efecto detergente tras su acumulación dentro del parásito. Este efecto puede provocar numerosas alteraciones celulares, como la interferencia en la biosíntesis y metabolismo de los fosfolípidos, alteraciones del potencial de membrana mitocondrial produciendo la muerte por apoptosis o la inhibición de la citocromo C oxidasa<sup>69</sup>.

El principal mecanismo de resistencia que han desarrollado los parásitos frente a la miltefosina consiste en disminuir su concentración intracelular mediante inactivación del complejo proteico encargado de su internalización<sup>70</sup>. Este complejo se sitúa en la membrana plasmática de los parásitos y está constituido al menos por



dos proteínas: una subunidad catalítica (MT, de Miltefosine Transporter), perteneciente a la familia de las fosfolípido translocasas o P4-ATPasas, y una subunidad beta (Ros3), perteneciente a la familia de proteínas Cdc50<sup>70</sup>. Otro mecanismo de reducción intracelular de miltefosina está relacionado la sobreexpresión de los transportadores ABCB4/MDR1 (el primer mecanismo de resistencia a miltefosina descrito<sup>71</sup>), ABCG4<sup>72</sup> y ABCG6<sup>73</sup>, que expulsan el fármaco al exterior<sup>74</sup>. Inhibidores de ABCB4/MDR1 de *Leishmania* revierten *in vitro* la resistencia a miltefosina conferida por este transportador<sup>61,74</sup>. Aunque mutaciones en el complejo LMT/Ros3, lo convierten en afuncional e impiden que la miltefosina sea transportada al interior de la célula, se ha logrado que el fármaco pueda atravesar la membrana celular sin necesidad de utilizar el transportador. Para ello, se unió la miltefosina a un péptido penetrante (Tat), de tal forma, que el complejo miltefosina-Tat puede atravesar la membrana sin necesitar del transportador. Una vez dentro de la célula el complejo se separa y la miltefosina actúa frente al parásito causante de la enfermedad<sup>69,75</sup>. Queda por determinar si los transportadores tipo ABCB4/MDR1 podrían expulsar este complejo y conferir resistencia.

La **paromomicina**, es un antibiótico aminoglicosídico aislado inicialmente de *Streptomyces chrestomyceticu*. Su actividad leishmanicida se identificó por primera vez en 1960 y el primer ensayo en humanos se realizó en Kenia en 1980<sup>76</sup>. A pesar de su bajo coste, este medicamento nunca fue una opción para tratar a pacientes con leishmaniasis debido a su mala absorción y a que su administración es intramuscular. Los mecanismos de acción de la paromomicina en *Leishmania* son poco conocidos, pero se ha descrito que la inhibición de la síntesis de proteínas y la alteración del potencial de membrana mitocondrial<sup>77</sup>. Los principales efectos adversos son nefrotoxicidad y ototoxicidad. Hasta la fecha no se ha descrito la aparición de resistencia clínica al fármaco, no obstante, *in vitro* se han generado cepas resistentes a paromimicina que mostraron un aumento en la expresión de la proteína fosfatasa 2A y de los transportadores ABC MDR1 y MRPA<sup>78</sup>.

Además de los descritos anteriormente, varias alternativas terapéuticas de segunda línea son empleadas en el tratamiento de la leishmaniasis. El **imiquimod** (amina imidazoquilina de administración tópica), el **alopuriol** (análogo tóxico de hipoxantina que interfiere en la síntesis del ARN) y la **pentoxifilina** (derivado de la

xantina con acción inmunomoduladora), son compuestos que poseen una acción coadyudante cuando se combinan con los antimoniales pentavalentes<sup>19</sup>.

Los **azoles**, antifúngicos que inhiben la ruta de síntesis del ergosterol, han sido utilizados para el tratamiento de la leishmaniasis tegumentaria. Algunos estudios han demostrado la eficacia del fluconazol, ketoconazol e itraconazol con una tasa de curación de entre 55 y 79% en el Viejo Mundo. Como efectos adversos presentan síntomas gastrointestinales y hepatotoxicidad, que deben ser vigilados debido a su importancia<sup>45</sup>.

La **azitromicina** presenta actividad *in vitro* e *in vivo* frente a *L. major*, pero su mecanismo de acción aún no se conoce. Se utiliza en el tratamiento de la leishmaniasis cutánea. La **dapsona** y la **rifampicina** también se utilizan para tratar la leishmaniasis. Con el uso de dapsona, se observó una tasa de curación del 82% en el Viejo Mundo, sin embargo, la respuesta en el Nuevo Mundo fue mínima<sup>45</sup>.

En la mayoría de los escenarios de medicamentos antimicrobianos, existe una conciencia creciente de que las **terapias combinadas** ofrecen beneficios sustanciales, incluida la superación de las resistencias. En el caso de la malaria, el SIDA y la tuberculosis, se han realizado esfuerzos considerables para buscar una terapia de combinación óptima basada tanto en el modo de acción de los fármacos asociados como en sus parámetros farmacocinéticos. Características como el tiempo de eliminación del parásito y la vida media del fármaco guían la selección racional de combinaciones<sup>79</sup>.



La OMS ha recomendado en los últimos años el empleo de estas terapias combinadas, con el objetivo de reducir las dosis, la duración, el coste y la toxicidad, así como para mejorar la eficacia en los casos especialmente complicados y en las coinfecciones con VIH<sup>80</sup>. La terapia de combinación en pacientes con LV en la India consiste en una sola dosis de AmB liposomal junto con miltefosina o una sola dosis de AmB liposomal más paromomicina. Estibogluconato de sodio más paromomicina son la recomendación de la OMS para Sudán. Finalmente, y para otros países de África oriental, la OMS recomienda varias terapias combinadas, incluida una dosis única de AmB liposomal seguida de miltefosina, o AmB administrada

simultáneamente con estibogluconato de sodio, o estibogluconato de sodio más paromomicina.

Para cada especie de *Leishmania*, hay que establecer una terapia combinada, con el fin de obtener tasas de recaída más bajas en comparación con el uso de monoterapia. No obstante, numerosos estudios han demostrado que, aunque es más difícil para *Leishmania* adquirir resistencia a la terapia combinada que a la monoterapia, la resistencia a las combinaciones es posible (especialmente cuando la paromomicina es uno de los fármacos asociados). Esto tiene una relevancia clínica importante para el uso de terapias combinadas y su impacto en los programas de control de la leishmaniasis<sup>78,81</sup>.



**Figura 9. Enfermos de kala-azar en el estado indio de Bihar.** Imagen tomada de *Médicos Sin Fronteras*.

## 1.2 Enfermedad del Sueño

### 1.2.1 Generalidades

La tripanosomiasis africana humana, también denominada enfermedad del sueño, es una parasitosis causada por el protozoo *Trypanosoma brucei*, un parásito unicelular que se aloja en el torrente sanguíneo, los espacios intersticiales de los tejidos periféricos y eventualmente en el cerebro donde conduce al coma y la muerte en ausencia de tratamiento. Esta enfermedad ocurre en 36 países del África subsahariana donde la mosca tsetse (género *Glossina*) es la responsable de su transmisión. Gracias a las iniciativas sostenidas de control de la enfermedad, el número de nuevos casos notificados ha disminuido considerablemente. Sin embargo, y debido al cambio climático, es posible que pueda verse alterado el ciclo de vida de *Glossina* así como su distribución geográfica, aumentando el área en riesgo de infección para humanos<sup>19</sup>.

Las dos subespecies involucradas en la tripanosomiasis humana africana humana (HAT) son *Trypanosoma brucei gambiense*, presente en 24 países de África occidental y central, representando más del 97% de los casos notificados y causando una infección crónica, y *Trypanosoma brucei rhodesiense*, el cual se encuentra en 13 países de África oriental y del sur, representando a día de hoy, menos del 3% de los casos notificados y causando una infección aguda. La enfermedad evoluciona rápidamente y afecta al sistema nervioso central. Sólo en Uganda son prevalentes las dos formas de la enfermedad, pero en zonas separadas<sup>82</sup>.



El curso de la enfermedad del sueño incluye diversas etapas. En la primera etapa o **fase hemolinfática**, los tripanosomas se multiplican en los tejidos subcutáneos, la sangre y la linfa. Se caracteriza por episodios de fiebre, cefaleas, dolores articulares y prurito. En la segunda etapa o **fase neurológica o meningoencefálica**, los parásitos atraviesan la barrera hematoencefálica e infectan el sistema nervioso central. Por lo general, es entonces cuando se presentan los signos y síntomas más evidentes de la enfermedad, como son: cambios de comportamiento, confusión, trastornos sensoriales y falta de coordinación. Los

trastornos del ciclo del sueño, que le dan el nombre a la enfermedad, son una característica importante de la segunda etapa. Si no se trata, la enfermedad normalmente es mortal, si bien se han notificado casos de portadores sanos<sup>82</sup>.

La **tripanosomiasis animal africana (TAA)** o, **Nagana**, representa uno de los principales problemas para el desarrollo de los países del África subsahariana. Se estima que un 30% del ganado africano está en riesgo de infección<sup>83,84</sup>. *T. b. brucei*, *T. congolense*, *T. evansi* y *T. vivax* son los responsables de la infección en ganado bovino, equino y pequeños rumiantes, y *T. simiae* en cerdos. *T. simiae* y *T. vivax* pueden también transmitirse por tabánidos y otros insectos hematófagos.

Aunque las distintas especies son morfológicamente indistinguibles entre sí, su separada distribución geográfica facilita el diagnóstico en la práctica (figura 10).



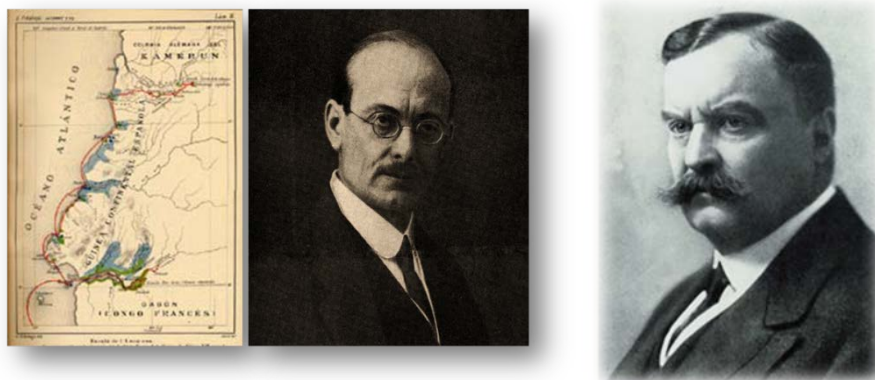
**Figura 10. Distribución geográfica de la Enfermedad del Sueño.** Adaptada de Slideshare.

La incidencia de la enfermedad varía de un país a otro y dentro de un mismo país, de una región a otra. En los últimos 10 años, más del 70% de los casos notificados ocurrieron en la República Democrática del Congo; La República Centroafricana notificó en 2015, entre 100 y 200 nuevos casos por año mientras que Angola, Burkina Faso, Camerún, Chad, Congo, Côte d'Ivoire, Gabón, Ghana, Guinea, Guinea Ecuatorial, Kenya, Malawi, Nigeria, República Unida de Tanzania, Sudán del Sur, Uganda, Zambia y Zimbabwe notifican menos de 100. Ningún caso ha sido



notificado durante ese periodo en Benín, Botswana, Burundi, Etiopía, Gambia, Guinea Bissau, Liberia, Malí, Mozambique, Namibia, el Níger, Rwanda, el Senegal, Sierra Leona, Swazilandia y el Togo. La transmisión de la enfermedad parece haberse detenido en algunos de estos países, pero todavía hay áreas donde el acceso para evaluar el estado exacto de la situación es difícil debido a la inestabilidad político/social y/o la dificultad para acceder a las actividades de supervisión y diagnóstico<sup>82</sup>.

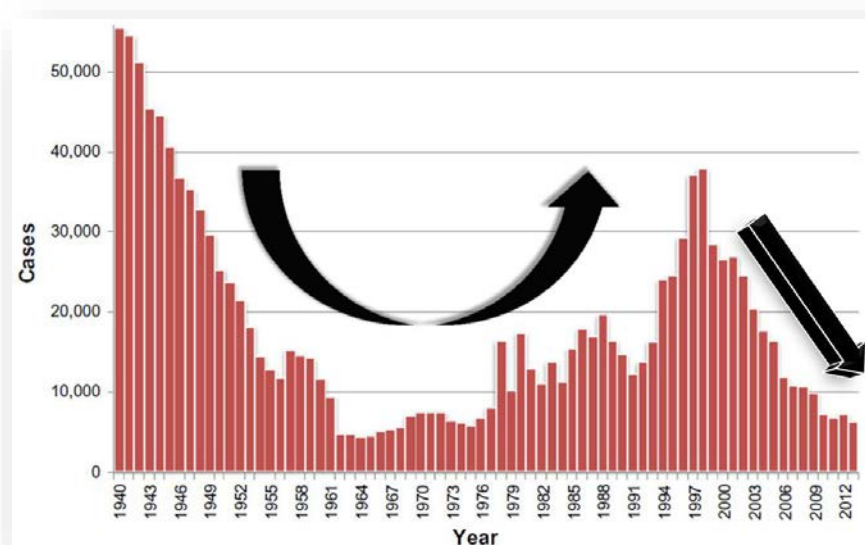
La enfermedad del sueño de los indígenas africanos se conocía desde comienzos del siglo XIX, pero no fue hasta 1902 cuando Dutton y Ford, dos médicos ingleses que trabajaban en Gambia, identificaron a *T. b. gambiense* como agente causal de la tripanosomiasis humana. Un año después, Sir David Bruce identificó a la mosca tse-tsé como el vector. Esta enfermedad a principios del siglo XX produjo una enorme mortalidad en las poblaciones indígenas en los diferentes territorios del África ecuatorial. La preocupación que generó en los gobiernos de las naciones coloniales motivó que en la primera década del siglo XX se organizaran varias expediciones científicas para estudiar la enfermedad, llevadas a cabo por investigadores ingleses (Dutton y Castellani 1901-1903, entre otros), franceses (1906-1908), portugueses, alemanes (Koch 1907) y españoles (Cajal y Pittaluga 1909)<sup>85</sup>.



**Figura 11. Gustavo Pittaluga Fattorini (1876-1956) y el trayecto seguido por la expedición en el territorio continental de la Guinea Española (izda)<sup>85</sup>. Sir David Bruce (1855-1931) (dcha)<sup>86</sup>.**

En la década de los años 20, la enfermedad provocó graves daños en África subsahariana, organizándose campañas de erradicación mediante detección sistemática de casos con equipos móviles y actividades de lucha antivectorial, que permitieron mantener la enfermedad bajo control hasta bien entrada la década de los 60. Pero desafortunadamente, en los años siguientes, con el empobrecimiento del continente y los problemas colaterales a la descolonización (emigración de los niveles superiores de las administraciones, guerras por el cambio de fronteras o regímenes políticos, etc.), la enfermedad del sueño volvió a convertirse en el azote de este continente.

A mediados de 2001, diferentes organizaciones supranacionales: Fondo Alimentario Mundial (FAO), Organización Mundial de la Salud (OMS), y Organización de Estados Africanos (OUA), en colaboración con Organizaciones no Gubernamentales y agencias nacionales de salud, lanzaron el Programa contra la Tripanosomiasis Africana, a la que siguió poco después la Campaña Panafricana de Erradicación de la mosca tse-tsé y la Tripanosomiasis (PATTEC). Estas acciones pretenden la erradicación de la enfermedad, tanto a nivel humano como animal<sup>87</sup>.

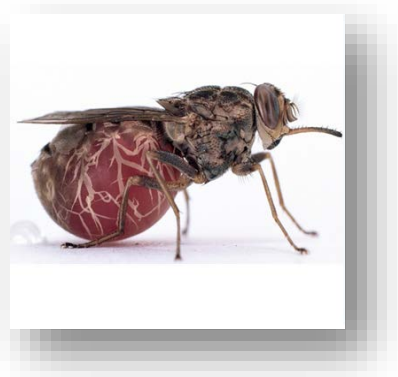


**Figura 12. Número total de casos reportados de HAT por la OMS desde 1940-2013.**

### 1.2.2 Agente etiológico

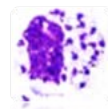
El agente etiológico causante de la enfermedad, *Trypanosoma brucei*, es un protozoo parásito monoflagelado perteneciente a la familia *Trypanosomatidae*, orden *Kinetoplastida*. Su genoma tiene 26 Mb organizados en 11 cromosomas grandes<sup>88</sup>. Incluye tres subespecies morfológicamente indistinguibles *T. b. brucei*, que no infecta a los seres humanos y es responsable de la TAA, *T. b. rhodesiense* y *T. b. gambiense* que pueden infectar a las personas ya que son resistentes a la apolipoproteína A1 (una proteína sérica que desencadena la muerte en otros tripanosomas).

Los vectores biológicos más importantes de la tripanosomiasis africana son las moscas hematófagas del género *Glossina*, conocidas vulgarmente como moscas tsé-tsé (orden *Diptera*, suborden *Cyclorhapha*, familia *Glossinidae*) (figura 13). Este género incluye 23 especies y se subdivide generalmente en tres subgéneros (*Austenina*, *Namorhina* y *Glossina*) que corresponden a los distintos grupos de especies encontrados en diferentes entornos ecológicos<sup>22</sup>.



**Figura 13. Mosca tsé-tsé.**

En la sangre y los tejidos de los mamíferos, los tripanosomas se observan con mayor frecuencia como células en forma de huso que tienen 20-30  $\mu\text{m}$  de largo (aproximadamente tres veces el diámetro de un eritrocito humano) y 2-5  $\mu\text{m}$  de ancho, y se caracterizan por su movimiento retorcido. A veces, se observan formas más cortas que están adaptadas metabólicamente para sobrevivir en los intestinos de la mosca tse-tsé.



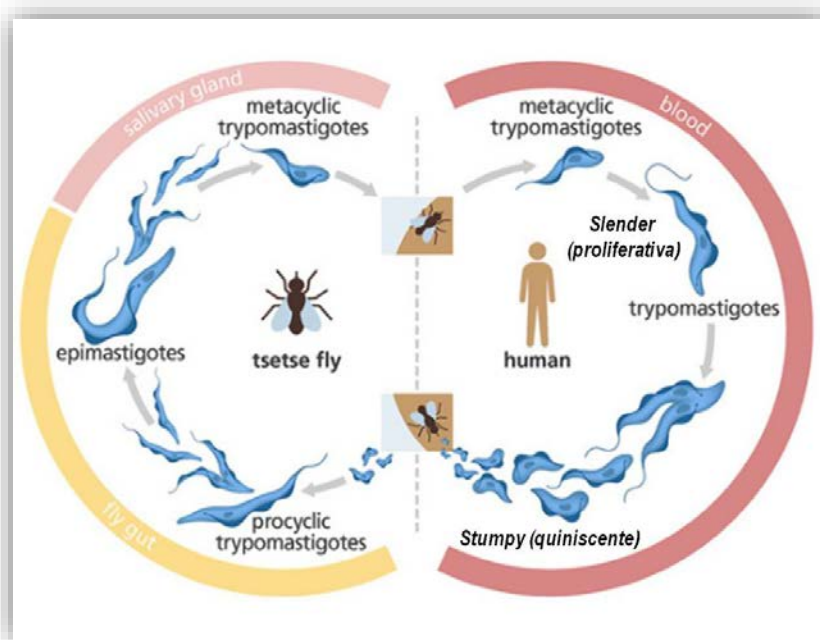
En el huésped mamífero, la membrana celular del tripanosoma está cubierta por una capa densa de dímeros de glicoproteínas idénticas que protege la membrana subyacente contra ataques inmunológicos innatos, como el complemento. Estas glicoproteínas altamente inmunogénicas inducen una respuesta inmune específica, desencadenando la destrucción de todos los tripanosomas por opsonización. Para sobrevivir a esta respuesta inmune mediada por anticuerpos, los tripanosomas han desarrollado una variación antigénica, siendo capaces de reemplazar la capa de glicoproteínas por una capa antigénicamente diferente<sup>89,90</sup>.

### 1.2.3 Ciclo de vida

Al igual que en *Leishmania* los tripanosomas alternan su ciclo de vida entre el insecto vector y un hospedador mamífero. Debido a la enorme diferencia entre ambos hospedadores, los tripanosomas sufren importantes cambios morfológicos y metabólicos que permiten al parásito adaptarse rápidamente a nuevos entornos tan diferentes como son la sangre de un hospedador mamífero y el tracto digestivo del vector artrópodo<sup>91,92,93</sup>.

Tras la picadura, la mosca tsé-tsé inocular en el hospedador mamífero los **tripomastigotes metacíclicos** infectivos de *T. brucei*. Estos tripomastigotes metacíclicos se diferencian a **tripomastigotes de la forma sanguínea alargada** (long slender) y comienzan a replicarse en la sangre. Unos 6-10 días posteriores a la infección, los parásitos comienzan a diseminarse y replicarse por todo el cuerpo a través del sistema circulatorio, pudiendo alcanzar también el sistema nervioso al traspasar la barrera hematoencefálica. En el pico de parasitemia, algunos tripomastigotes alargados se diferencian a **tripomastigotes de la forma sanguínea redondeada** (stumpy), no replicativos y preadaptados para sobrevivir en la mosca tsé-tsé. Estas formas pueden ser ingeridas de nuevo por una mosca tsé-tsé cuando pica para alimentarse y en el intestino de esta, se transforman en **tripomastigotes procíclicos**, la forma replicativa no infectiva. Estas formas se dividen mediante fisión binaria, colonizan el intestino medio del insecto y migran hacia las glándulas salivales de la mosca donde rápidamente se transforman en **epimastigotes**, quedando adheridos por el flagelo a la pared de las glándulas.

Los epimastigotes continúan replicándose y finalmente se transforman en tripomastigotes metacíclicos, que serán transmitidos por la mosca al hospedador mamífero, completándose así el ciclo<sup>94</sup>.



**Figura 14. Ciclo de vida de *T. brucei*.** El ciclo de vida de *T. brucei* alterna entre el insecto vector (la mosca tse-tse) y un huésped mamífero. Tanto en el insecto vector como en el huésped mamífero, la colonización ocurre a través de la proliferación de formas de tripanosoma que se dividen rápidamente. Estas formas eventualmente se transforman en células del parásito en reposo (quiescentes) que están preprogramadas para la diferenciación celular después de cambios en el ambiente (es decir, transferencia de un huésped a otro). Las formas alargadas y esbeltas del torrente sanguíneo también se adaptan a su entorno mientras están presentes en el huésped mamífero, y esta adaptación implica una variación continua del antígeno de superficie principal, que se conoce como glicoproteína de superficie variante. Tomada de [www.yourgenome.org/facts/what-is-african-sleeping-sickness](http://www.yourgenome.org/facts/what-is-african-sleeping-sickness)

La capacidad de las células de evaluar su entorno y responder a los cambios en él es fundamental para su supervivencia. En el hospedador mamífero, el control de la densidad celular y su regulación es necesaria para asegurar la disponibilidad de nutrientes y espacio, previniendo la acumulación de desechos metabólicos tóxicos. Esta capacidad celular de “sensar” su densidad crítica se conoce como “**quórum sensing**”, y la realiza utilizando diferentes moléculas señalizadoras y generando respuestas en base a esto. Este mecanismo de respuesta asociado a la densidad celular, con frecuencia conlleva el desarrollo de quiescencia (usualmente

acompañada de cambios morfológicos y metabólicos) para promover la supervivencia celular bajo condiciones donde los recursos son escasos<sup>95</sup>.

Recientemente se ha descrito que la piel es un reservorio importante para los tripanosomas, ya que los parásitos que viven en ella son viables. De hecho, las formas slenders de la piel podrían diferenciarse con éxito en formas stumpy. Estudios han demostrado que moscas tsé-tsé alimentadas de ratones que contenían tripanosomas en su piel pero no en su sangre se han infectado por el parásito. Esto sugiere que los parásitos que habitan en la piel pueden contribuir a la transmisión de la enfermedad <sup>96</sup>.

Por otro lado, también se ha demostrado, que si bien la sangre es el principal lugar de acumulación de los parásitos durante el primer pico de parasitemia, conforme avanza la infección los tejidos grasos son los que contienen la densidad más alta de parásitos (de 100 a 800 veces más que el cerebro). Estos parásitos, se adaptan funcionalmente al entorno tisular y son capaces de utilizar lípidos/ácidos grasos como fuente de carbono <sup>97</sup>.

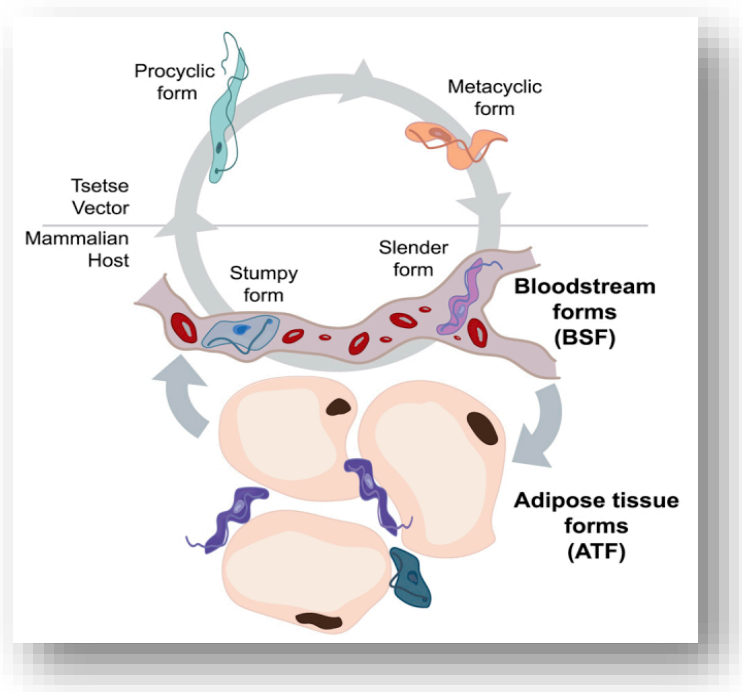
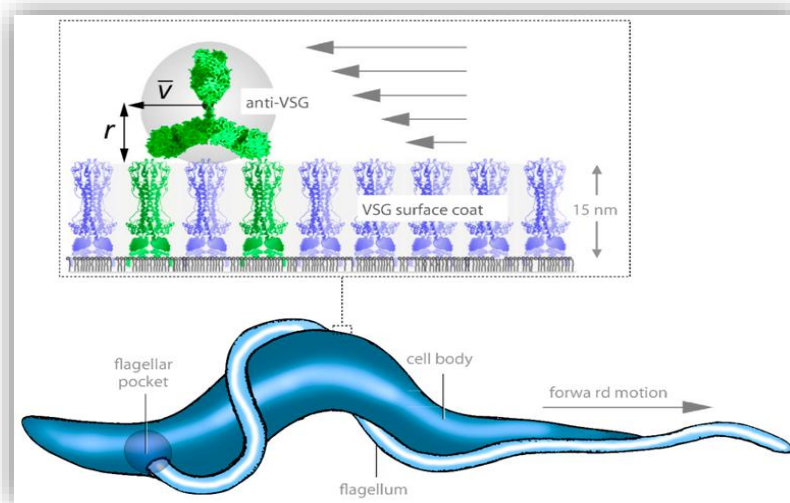


Figura 15. Imagen representativa de *T. brucei* acumulándose en el tejido adiposo<sup>97</sup>.

En estos entornos (piel y tejido graso) los parásitos están menos expuestos al sistema inmune y actúan como reservorio para el mantenimiento de la enfermedad. De esta forma, la mosca tsé-tsé podría reinfectarse con tripomastigotes, incluso de individuos asintomáticos. Este hallazgo podría explicar por qué la enfermedad del sueño ha persistido en algunas áreas a pesar del tratamiento y la vigilancia<sup>98</sup>.

#### 1.2.4 Mecanismos de evasión parasitaria: variación antigénica

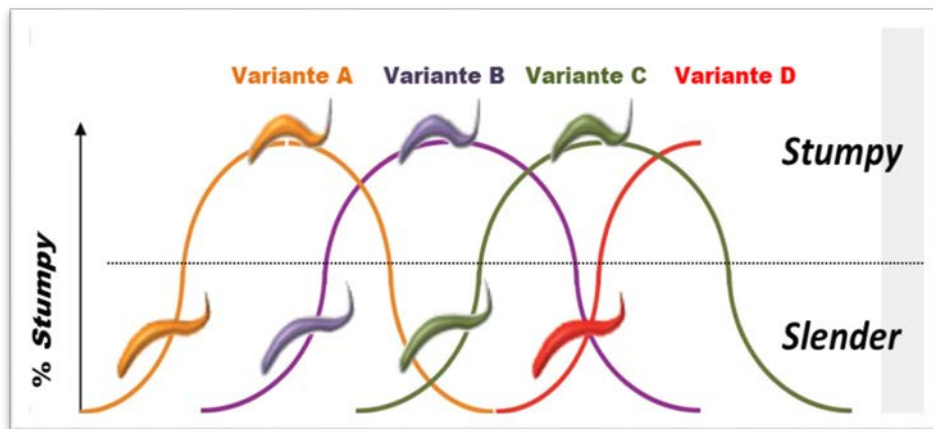
La primera barrera de protección de *T. brucei* es una monocapa superficial densa que cubre toda la membrana plasmática del parásito, con alrededor de  $10^7$  moléculas de una glicoproteína única conocida como **glicoproteína variante de superficie (VSG, por su acrónimo en inglés)**. Existen unos 1.600 genes que dan soporte a las VSG, sin embargo sólo uno se expresa en cada momento, y tapiza la superficie del parásito. Las moléculas de VSG se unen a la membrana plasmática mediante el anclaje de **glicosilfosfatidilinositol (GPI)** formando homodímeros.



**Figura 16.** La motilidad celular y la endocitosis localizada son responsables de la evasión de anticuerpos. Como únicamente se expresa una VSG (cubriendo el cuerpo celular del tripanosoma), la respuesta inmune del hospedador se dirige específicamente contra esta capa superficial. Las VSG son proteínas que están ancladas a GPI en la membrana plasmática y esta modificación lipídica hace que las VSG sean altamente móviles (se difunden libre y rápidamente en la membrana). Los anticuerpos que se unen a las VSG (verde) se extienden por encima de la capa superficial inusualmente lisa y se impulsan hacia la parte posterior de la célula, donde se produce una endocitosis muy eficiente<sup>99</sup>.



Los homodímeros de VSG, forman una capa de glicoproteínas muy compacta que evita que los anticuerpos lleguen a los antígenos internos, además, la forma alargada de las VSG mantiene las toxinas alejadas de la membrana plasmática<sup>100</sup>. Cuando la infección ocurre en la sangre, la versión de VSG expresada es reconocida por el sistema inmune del hospedador, que comienza a producir IgM e IgG, capaces de neutralizar a los tripanosomas que reconocen, disminuyendo así el grado de parasitemia. Sin embargo, algunos tripanosomas sanguíneos cambian la VSG expresada en la superficie por otra versión con una región antigénica diferente, no reconocible por los anticuerpos circulantes, por lo que sobreviven y pueden seguir proliferando hasta que se desarrollen nuevos anticuerpos frente a ellos<sup>101</sup>.



**Figura 17. La cronicidad de la infección se logra mediante la aparición de una progresión de ondas de parasitemia con distintos tripanosomas que expresan diferentes capas antigénicas.** Las células detectan el aumento en su número, y en consecuencia detienen la división celular. Además, esto les asegura que la parasitemia no agotará al hospedador. El estudio de cepas pleomórficas *in vitro* permitió la identificación de un factor soluble de bajo peso molecular denominado "SIF" (*Stumpy Induction Factor*), que funciona como molécula señalizadora en la inducción de la diferenciación, descartando así la contribución del hospedador, y remarcando que este proceso es algo intrínseco del parásito <sup>102,103</sup>

El continuo juego entre la reacción del sistema inmune del hospedador y la variación antigénica del parásito sirven al tripanosoma para controlar su propio crecimiento, exhibiendo y después cambiando sus antígenos de superficie. El beneficio de esta estrategia lleva a una infección persistente debido a la presencia de un número constante y tolerable de parásitos en sangre en lugar de la muerte del hospedador por un crecimiento descontrolado de la población



parasitaria <sup>101</sup>. El cambio ocurre bien por un cambio del gen de la VSG de uno de los 20 sitios de expresión conocidos (por recombinación del ADN) o por silenciamiento del sitio de expresión activo y la activación de otro sitio de expresión diferente en otro cromosoma, lo que se denomina activación *in situ*. El fenómeno de variación antigénica hace muy difícil desarrollar una vacuna contra la enfermedad<sup>104,105</sup>.

### 1.2.5 Inmunidad innata en primates/humanos

A pesar de que todos los tripanosomas africanos son tolerantes a una amplia variedad de hospedadores, los seres humanos y los primates superiores no pueden ser infectados por *T. brucei brucei* debido a que han desarrollado una inmunidad innata mediada por el **Factor Tripanolítico (TLF)**<sup>106</sup>. Se han encontrado dos isoformas diferentes de TLF (TLF1 y TLF2) y ambas proteínas son fundamentales para su acción.

TLF1 es una subclase de partículas lipoproteicas de alta densidad (HDL) definidas por dos apolipoproteínas específicas de primate: ApoL1, una proteína formadora de poros que se inserta en membranas aniónicas a pH bajo <sup>106,107</sup> y la proteína relacionada con haptoglobina (Hpr), la cual tiene una identidad de secuencia de más del 95% con haptoglobina humana (Hp), una proteína sérica de fase aguda no asociada a HDL. La función principal de Hp es unir Hb libre, previniendo el daño oxidativo inducido por el hemo.



*T. brucei*, como el resto de parásitos tripanosomátidos, es auxótrofo para el grupo hemo, por lo que debe tomarlo del hospedador infectado. Las formas sanguíneas de *T. brucei* adquieren hemo al internalizar la hemoglobina unida a la haptoglobina a través un receptor de superficie específico (TbHpHbR) localizado dentro del bolsillo flagelar de *T. b. brucei*<sup>108</sup>.

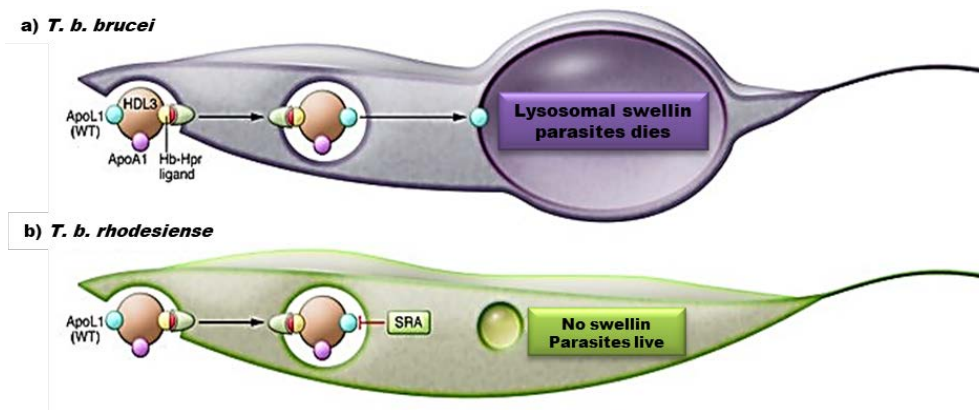
Este receptor no discrimina entre Hp-Hb y Hpr-Hb, por lo tanto, internaliza también TLF1. De este modo, las formas sanguíneas de *T. brucei* endocitan los complejos TLF1, que contienen ApoL1, a través del receptor TbHpHbR. En el compartimento endolisosomal, al bajar el pH ApoL1 se disocia del complejo y se inserta en la membrana, formando poros iónicos. La tripanolisis se produce debido al flujo de iones cloruro a través de la membrana que conllevan un hinchamiento osmótico del fagolisosoma<sup>92</sup>. Por su parte, Hpr y Hb se degradan en el fagolisosoma

liberando el hemo que es transportado por TbHRG hasta el citosol<sup>109</sup> donde es incorporado a las hemoproteínas de la forma sanguínea<sup>92</sup>. Recientemente se ha propuesto que ApoL1 induce también la permeabilización de la membrana mitocondrial de *T. b. brucei*, provocando un muerte celular similar a la apoptosis <sup>110</sup>.

Por otra parte, La proteína Hpr también se encuentra en TLF2, pero el mecanismo de entrada de TLF2 no se conoce. La hipótesis no probada de entrada de TLF-2, es que IgM (componente principal de TLF-2) se une de forma inespecífica a las VSG, de tal forma que el reciclaje de la cubierta de VSG a través del bolsillo flagelar conduce a TLF-2 al compartimento endocítico del parásito, liberando también ApoL1<sup>91</sup>.

*T. b. rhodesiense* y *T. b. gambiense* han desarrollado mecanismos de resistencia al TLF y por ello son capaces de causar HAT. En el caso de *T. b. rhodesiense* la resistencia la confiere una única proteína asociada a la resistencia al suero (SRA). SRA tiene una estructura muy similar a las VSG con una delección en el extremo N-terminal. El gen que expresa SRA se encuentra localizado en un lugar de expresión de una VSG (ESAG). Los ESAG se encuentran dentro de los lugares de expresión de las formas sanguíneas (BES). En el tripanosoma, solo hay un BES activo en un momento dado que expresa la VSG activa. Para que *T. b. rodhesiense* sea resistente al suero, el gen que expresa SRA debe estar en el BES activo en los primeros momentos de la infección (figura 18).

SRA se localiza en la superficie del bolsillo flagelar y tras la endocitosis del TLF o durante el recambio de VSG se encuentra en los endosomas y en los lisosomas. Actúa uniéndose a una  $\alpha$ -hélice del extremo C-terminal de la ApoL1, de forma que la inhibe e impide la lisis del parásito <sup>100</sup>.



**Figura 18. a) El complejo ApoL1 es absorbido por *T. b. brucei* a través del receptor Hb-Hpr.** ApoL1 es transitada hacia el lisosoma, donde el pH ácido causa un cambio conformacional, lo que lleva a la activación de la función del canal aniónico en el extremo N- terminal ApoL1. El hinchazón lisosomal mata al tripanosoma. Por lo tanto, ApoL1 confiere inmunidad innata contra este parásito. **b) Con el tiempo, *T. b. brucei* desarrolló un factor de virulencia llamado SRA que puede inactivar la proteína ApoL1,** aunque se desconoce la ubicación celular de esta interacción. Estos tripanosomas que expresan SRA evolucionaron en *T. b. rhodesiense*<sup>111</sup>.

En el caso de *T. b. gambiense* cabe diferenciar entre los grupos 1 y 2. *T. b. gambiense* tipo 1 tiene varios mecanismos de resistencia: a) disminución en la entrada de TLF-1, debido a que la proteína HpHbR tiene niveles de expresión reducidos<sup>112</sup> y presenta una mutación que disminuye la afinidad al complejo HpHb<sup>113</sup> b) la expresión de la glicoproteína específica TgsGP, la cual es una versión truncada de VSG<sup>114,115</sup> que se localiza en el compartimento endocítico y funciona alterando la fluidez de la membrana de forma que evita la acción de ApoL1<sup>116</sup> y c) una tercera posibilidad menos estudiada consistente en la degradación de las partículas de TLF o de la ApoL1 por las cisteín-proteasas que se encuentran en los endosomas o lisosomas<sup>116,117</sup>.

En *T. b. gambiense* tipo 2 la resistencia es independiente de mutaciones en TbHpHbR. Se ha visto que este subgrupo muestra un fenotipo variable en cuanto a la resistencia por la lisis de ApoL1, pero tanto los organismos resistentes como los sensibles internalizan TLF1. Esto indicaría que la resistencia de este subgrupo está relacionada con una capacidad de neutralizar los efectos de ApoL1, sin intentar evitar su internalización como hace el tipo 1 de esta misma subespecie<sup>107</sup>.

Recientemente se han identificado dos variantes de APOL1 recombinante (rAPOL3 y rAPOL1), capaces de lisar eficientemente *in vitro* a *T. b. rhodesiense* y *T. b. gambiense*. La capacidad diferencial entre rAPOL3 y rAPOL1 para matar los tripanosomas, se asoció con una dependencia distinta del pH ácido para la actividad. Por lo tanto, el pH influye en el potencial tripanolítico de las rAPOL<sup>118</sup>.

### 1.2.6 Tratamiento farmacológico

Cinco medicamentos se utilizan de forma rutinaria en el tratamiento de la tripanosomiasis africana humana: **pentamidina** y **suramina** para tratar la enfermedad en la primera etapa, y **melarsoprol**, **eflornitina** y **nifurtimox** para la enfermedad en la segunda etapa, ya que estos fármacos son capaces de cruzar la barrera hematoencefálica, a diferencia de los primeros.

Cuanto antes se trate la tripanosomiasis africana humana, mejores serán las perspectivas de tolerabilidad y cura del tratamiento. La elección del tratamiento depende del agente causal y la etapa de la enfermedad (tabla 3). Los medicamentos para el tratamiento de la enfermedad en la primera etapa generalmente no curarán la enfermedad en la segunda etapa. De manera similar, el uso de fármacos de segunda etapa no se justifica en el tratamiento de la enfermedad en la primera etapa porque éstos requieren cruzar la barrera hematoencefálica, y tienden a ser más tóxicos y complejos de administrar que los fármacos de la primera etapa.

El **isetionato de pentamidina** es el tratamiento de primera línea para la infección por *T. brucei gambiense* en la primera etapa de la enfermedad (con una eficacia del 95-98%), y es una alternativa para el tratamiento frente a *T. brucei rhodesiense* (pero los datos en la eficacia en esta cepa son limitados<sup>119,120</sup>). La pentamidina, generalmente es bien tolerada. Cuando la administración es por vía intramuscular, la inyección causa dolor e inflamación transitoria. Otros síntomas adversos incluyen hipoglucemia, hipotensión, dolor abdominal y problemas gastrointestinales<sup>121</sup>.

La **suramina**, es efectiva en la primera etapa de la enfermedad frente a las dos subespecies de *T. brucei*, pero únicamente se usa en el tratamiento de la enfermedad frente a *T. b. rhodesiense* debido al riesgo de coinfección por oncocercosis en áreas endémicas de *T. b. gambiense* (esto puede provocar

reacciones alérgicas que surgen de la muerte rápida de microfilarias), además porque la administración de pentamidina es más simple. La suramina se administra mediante infusión intravenosa lenta. Los programas de tratamiento recomendados son complejos y duran hasta un mes. Se administra una dosis de prueba antes del tratamiento debido al riesgo de reacciones de hipersensibilidad aguda. Los efectos adversos son frecuentes pero principalmente leves y reversibles, e incluyen pirexia, nefrotoxicidad, neuropatía periférica, agranulocitosis y trombocitopenia.

**Tabla 3. Tratamiento estándar para la tripanosomiasis africana humana según cepa y etapa<sup>122</sup>.**

<i>Trypanosoma brucei gambiense</i>		
	1ª línea de tratamiento	Dosis
<b>Primera etapa</b>	<b>Pentamidina</b>	4 mg/kg/día Intramuscular ó intravenoso (diluido en solución salina, en infusions de 2h), durante 7 días
<b>Segunda etapa</b>	<b>Terapia combinada</b> <b>Nifurtimox–eflornitina</b>	Nifurtimox 15 mg/kg/día Vía oral en tres dosis durante 10 días;  Eflornitina 400 mg/kg/día Vía intravenosa en 2 infusiones de 2h (cada dosis diluida en 250 mL de agua para inyección)* durante 7 días
<i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i>		
	1ª línea de tratamiento	Dosis
<b>Primera etapa</b>	<b>Suramina</b>	Dosis de prueba de 4-5 mg /kg por vía intravenosa (día 1), luego 20 mg /kg por vía intravenosa una vez por semana durante 5 semanas (máximo 1g / inyección, por ejemplo, días 3, 10, 17, 24 y 31).
<b>Segunda etapa</b>	<b>Melarsoprol</b>	2, 2 mg / kg por día por vía intravenosa durante 10 días

\*Niños que pesen <10 kg: diluir en 50 mL de agua para inyección. Niños que pesan 10-25 kg: diluir en 100 mL de agua para inyección. Si el agua para inyección no está disponible, la eflornitina se puede diluir en dextrosa al 5% o solución salina.

El **melarsoprol**, derivado del arsénico, fue el fármaco más utilizado para la segunda fase de la enfermedad. Es un fármaco muy tóxico con numerosos efectos secundarios severos que pueden llegar a matar al 5-10% de los pacientes, debido probablemente a respuestas inmunes anormales por la lisis rápida de grandes cantidades de parásitos en el cerebro, toxicidad por arsénico y otros mecanismos autoinmunes. Actualmente, el melarsoprol se está sustituyendo por la terapia combinada; el **nifurtimox**, es un fármaco oral que se utiliza a menudo para tratar la enfermedad de Chagas y que tiene una eficacia limitada cuando se utiliza sólo en la enfermedad del sueño; la **eflornitina**, es un inhibidor de la ornitina descarboxilasa, la primera enzima de la síntesis de poliaminas y puede utilizarse en monoterapia o en terapia combinada con nifurtimox.

El tratamiento para la segunda etapa de la enfermedad de *T. b. gambiense* es la terapia combinada **nifurtimox-eflornitina (NECT)**. En 2009, NECT se incluyó en la lista de medicamentos esenciales de la OMS. En comparación con la monoterapia con melarsoprol o eflornitina, la NECT tiene tasas de curación más altas (95-98%), tasas de mortalidad más bajas (<1%), eventos adversos menos graves, administración más simple y se cree que evitan la resistencia a los medicamentos del parásito. La OMS suministra a los países endémicos, un kit de NECT completo que contiene todos los medicamentos y materiales necesarios para la administración. Los efectos adversos emergentes más comunes del tratamiento son dolor abdominal, vómitos y cefalea. El perfil de toxicidad responde al de las monoterapias con nifurtimox y eflornitina, pero con menor frecuencia y gravedad<sup>123,124</sup>.

El **Fexinidazol**, redescubierto por la DNDi, es un fármaco muy prometedor actualmente hay estudios clínicos (Fase II/III)<sup>125</sup> y se ha propuesto que puede contribuir a la eliminación de la HAT. Este fármaco representaría además, la única monoterapia administrada por vía oral disponible para el tratamiento de *T. b. gambiense*, y la primera nueva entidad química aprobada para la enfermedad desde principios de los años ochenta. La implementación de un medicamento como el fexinidazol podría llevar al HAT al borde de la eliminación. Sin embargo, estudios han demostrado que la generación de líneas de *T. brucei* resistentes a Nifurtimox provoca resistencia cruzada al fexinidazol tanto *in vitro* como *in vivo*. Por lo tanto,

esto podría sugerir un mecanismo de acción común para estos dos compuestos nitroaromáticos<sup>125,126</sup>.

## 2. Particularidades bioquímicas, celulares y moleculares en tripanosomátidos

---

Aunque inicialmente el estudio de estos protozoos flagelados se debió sobre todo a razones de salud pública, posteriormente el descubrimiento en ellos de una serie de peculiaridades tales como transcripción policistrónica, el mecanismo de trans-splicing o la edición del RNA mitocondrial, los ha convertido en interesantes modelos de estudio.

El **citoesqueleto** de los tripanosomátidos está formado por microtúbulos subpeliculares adosados a la membrana citoplasmática presentes en todo la superficie del organismo salvo en el bolsillo flagelar. La parte supercifial externa de los parásitos está recubierta por el glicocalix. Las principales moléculas de superficie son glicoproteínas ancladas con GPI, como las glicoproteínas variantes de superficies (VSG) de *T. brucei*, las mucinas de superficie de *T. cruzi* o los lipofosfoglicanos de *Leishmania*<sup>127,128</sup>.



Una característica común estos protozoos es que todos son **flagelados**. Los flagelos pueden existir como estructuras móviles extendidas, como ocurre en las formas promastigotes de *Leishmania* o *T. brucei*, o pueden estar presentes como estructuras cortas, no móviles que apenas emergen del cuerpo celular, como en el caso de la etapa amastigote intracelular de *T. cruzi* y *Leishmania*<sup>129</sup>.

Los esteroides son componentes esenciales de las membranas plasmáticas, sin embargo, a diferencia de las células de mamíferos, los tripanosomátidos sintetizan **ergosterol** ya que no poseen las enzimas necesarias para la síntesis de colesterol<sup>130-132</sup>. Las enzimas que catalizan la ruta de biosíntesis de los esteroides, exclusivas de tripanosomátidos y que son esenciales para ellos, como la hemoproteína lanosterol 14- $\alpha$  desmetilasa (CYP51) de la superfamilia de proteínas citocromo p450, están siendo estudiadas como dianas farmacológicas<sup>133,134</sup>.

Otra característica de estos protozoos parásitos es su capacidad de alterar el número de copias de genes individuales, grupos de genes, e incluso, cromosomas. Esta **plasticidad genética** les confiere una clara ventaja adaptativa<sup>135</sup>.

El DNA mitocondrial de los tripanosomátidos se encuentra ubicado en el **kinetoplasto**, el cual, se localiza cercano al bolsillo flagelar y perpendicular al eje del mismo. Este genoma está formado por numerosas copias de ADN circular, miles de minicírculos con un tamaño que oscila entre 0.5 y 2.5 kb que codifican para ARN guías que modifican los transcritos precursores derivados de unas pocas docenas de maxicírculos los cuales tienen un tamaño que oscila entre 20 y 40 kb. Estos son, estructural y funcionalmente, análogos al ADN mitocondrial de eucariotas superiores, codificando ARN ribosomales y proteínas involucradas en la cadena respiratoria y en la fosforilación oxidativa<sup>136,137</sup>.

La expresión de los maxicírculos implica un proceso de **edición del RNA** por el cual se generan RNAs que son diferentes de los genes de los que proceden. Este proceso supone la inserción o delección específica de residuos de uridina en los RNAs mensajeros mitocondriales hasta dar lugar a los mensajeros funcionales<sup>138</sup>. La edición del transcrito primario crea codones de iniciación o de terminación, corrige y extiende marcos de lectura. La información genética que dirige la edición reside en unos transcritos cortos mitocondriales (50-70 nucleótidos) también denominados RNA guías codificados principalmente por los minicírculos<sup>139</sup>. La especificidad del proceso está determinada por los RNA guía y es catalizado por un complejo multiproteico en el que se han identificado nucleasas exonucleasas, terminal uridil transferasas y ligasas específicas<sup>140</sup>. Se han identificado varias proteínas nucleares de este complejo, las cuales se unen a los RNA guías y resultan esenciales en la estabilidad de estas moléculas en la mitocondria<sup>141</sup>. Hasta el momento, sólo se han descrito fenómenos de edición en transcritos de genes codificados en el kinetoplasto<sup>142</sup>, siendo requeridos para la expresión aproximada de dos tercios de todos los genes mitocondriales<sup>141</sup>.

La **transcripción** en tripanosomátidos es **policistronica**, lo que significa que grandes regiones del genoma que contienen genes no relacionados entre sí, son transcritos al mismo tiempo. Dichos transcritos son procesados a nivel post-



transcripcional para dar lugar a los mensajeros monocistrónicos que serán traducidos a proteínas<sup>88</sup>.

En 1977, Oppenheimer y Borst informaron de la presencia de las primeras siete enzimas de la vía glucolítica de *T. brucei*, responsable de la conversión de glucosa a 3-fosfoglicerato, dentro de microcuerpos que denominaron **glicosomas**<sup>143</sup>. En la actualidad, un rasgo característico y bien estudiado de los protistas patógenos pertenecientes a la familia *Trypanosomatidae* es la compartimentación de la mayor parte de la ruta glucolítica en estos orgánulos similares a los peroxisomas. En estos orgánulos también se localizan multitud de enzimas implicadas en otros procesos celulares de gran importancia como son la ruta de las pentosas-fosfato, oxidación de ácidos grasos, biosíntesis lipídica, la biosíntesis de pirimidinas y la recuperación o salvamento de purinas<sup>144</sup>.

Los **acidocalcisosomas** son orgánulos electrodensos unidos a la membrana que se han conservado desde las bacterias a las células humanas, y se definen por sus propiedades comunes: la presencia abundante polifosfato inorgánico (polyP), reservas de calcio y otros cationes, y su acidez. La acidez característica de estos orgánulos se mantiene mediante dos bombas de protones (pirofosfatasa de protones vacuolares y ATPasa de protones vacuolares) y pueden actuar de manera independiente o de forma conjunta para mantener la acidez. Los estudios en tripanosomátidos han revelado el papel de polyP y acidocalcisosomas en la osmorregulación y la señalización de calcio<sup>145</sup>.

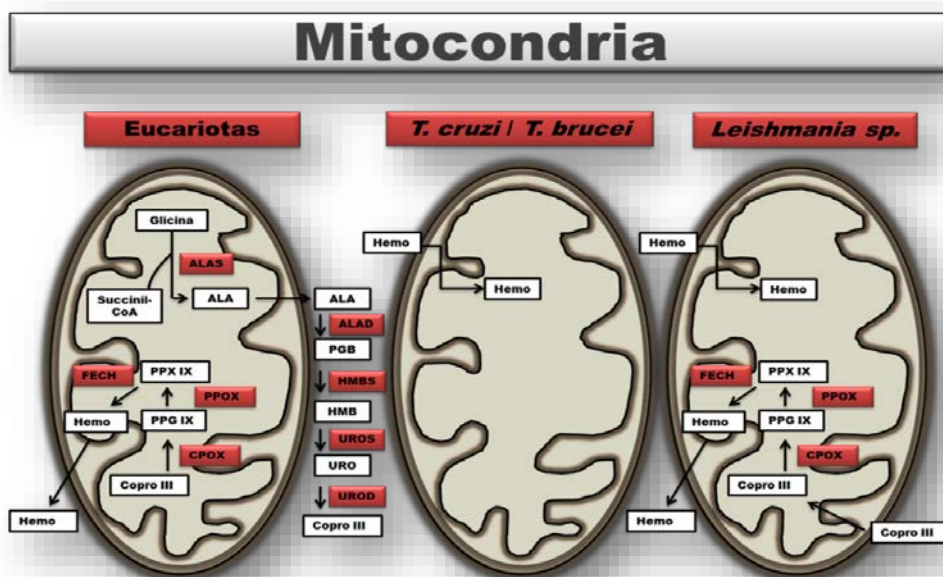


El **metabolismo de los nucleótidos** proporciona una gran fuente de dianas terapéuticas para muchas enfermedades ya que un reservorio equilibrado de desoxirribonucleótidos (dNTPs) es esencial para la replicación del ADN y su reparación<sup>146</sup>. En la mayoría de los organismos vivos, los dNTPs proceden de dos rutas, la síntesis *de novo* a partir de precursores metabólicos, y la ruta de reciclaje de purinas preformadas. En el caso de las purinas, los tripanosomátidos no pueden llevar a cabo su síntesis *de novo*, por lo que dependen totalmente del reciclaje de las purinas importadas del hospedador. Sin embargo, sí pueden realizar la síntesis *de novo* de las pirimidinas<sup>146,147</sup>.

El **tripanotión** (bisglutathionil-espermidina, T(SH)<sub>2</sub>) es un metabolito redox único y esencial de los parásitos tripanosomátidos, cuya ruta biosintética se considera un objetivo prometedor para los fármacos antiparasitarios. La síntesis de tripanotión ocurre por la conjugación consecutiva de dos moléculas de glutatión a espermidina. El tripanotión es el principal cosustrato redox de bajo peso molecular en tripanosomátidos. Los mamíferos no tienen homólogos de la enzima responsable de su síntesis, la tripanotión sintetasa (TryS)<sup>148,149</sup>.

Los tripanosomátidos son de los pocos organismos aeróbicos que, aún dependiendo de la fosforilación oxidativa, presentan **auxotrofia para el hemo**, es decir, son incapaces de sintetizar este metabolito esencial, por lo que necesitan obtener esta molécula a partir de fuentes exógenas. El hemo es un grupo prostético que forma parte de diversas proteínas y es esencial para la mayoría de las células existentes, ya que es indispensable para el funcionamiento de los citocromos, responsables del transporte de electrones en los complejos respiratorios, y otras enzimas que desempeñan importantes funciones biológicas<sup>150</sup>. Gracias a su capacidad de coordinar un átomo de hierro en el interior de su estructura, el hemo participa en reacciones de óxido-reducción catalizadas por hemoproteínas como los citocromos. Por esta razón, participa en multitud de procesos biológicos vitales entre los que se encuentra la fosforilación oxidativa en el transporte electrónico mitocondrial<sup>151</sup>. Su biosíntesis consta de una ruta de siete pasos muy conservada en los tres dominios de vida<sup>150,152</sup> (figura 19).

La auxotrofia de hemo en tripanosomátidos se debe a la pérdida de la vía completa de su síntesis, aunque el género *Leishmania* spp. posee las tres enzimas que catalizan las tres últimas reacciones de la ruta de biosíntesis del hemo (CPOX, PPOX y FeCH), readquiridas por transferencia horizontal desde  $\gamma$ -proteobacterias<sup>151-155</sup> (figura 19). La homeostasis de este metabolito es muy importante y requiere de una regulación precisa de su metabolismo a nivel de síntesis, tráfico y degradación. Dadas las propiedades químicas y bioquímicas de este metabolito, se necesita un sistema de transportadores y chaperonas para distribuirlo de forma específica y eficiente en las hemoproteínas que encontramos en distintos compartimentos celulares, a la vez que evitamos su toxicidad<sup>155</sup>.



**Figura 19. Biosíntesis de hemo en eucariotas y tripanosomátidos.** ALA: ácido  $\delta$ -aminolevulínico, PGB:porfobilinógeno; HMB: hidroximetilbilano; URO: uroporfirinógeno; COPRO III: coproporfirinógeno III; PPGIX: protoporfirinógeno IX; PPIX: protoporfirina IX; ALAS: ácido  $\delta$ -aminolevulínico sintasa o sintetasa; ALAD: ácido  $\delta$ -aminolevulínico deshidratasa; HMBS: hidroximetilbilano sintetasa; UROS: uroporfirinógeno sintetasa; UROD: uroporfirinógeno descarboxilasa; CPOX: coproporfirinógeno oxidasa; FECH: ferroquelatasa.<sup>153</sup>

Como hemos comentado con anterioridad, las formas sanguíneas de *T. brucei* endocitan los complejos Hp-Hb a través del receptor TbHpHbR. La hemoglobina es conducida a través de la ruta endocítica y digerida en el compartimento endolisosomal y el hemo libre liberado sería transportado por TbHRG hasta el citosol<sup>109</sup> donde es incorporado a hemoproteínas tales como CYP51 (esterol 14 $\alpha$ -demetilasa) esencial para el parásito<sup>133</sup>; Por otra parte, *Leishmania* spp. puede internalizar el hemo a través de LHR1, una proteína de membrana plasmática<sup>156</sup>, de la proteína LmFLVCRb (Cabello-Donayre M y col., paper submitted) o puede endocitar la hemoglobina a través de un receptor ya caracterizado<sup>157</sup>, dirigirla a los endosomas tardíos/lisosomas donde es digerida y de esta forma liberar el hemo. La proteína LHR1, localizada también en el compartimento endolisosomal, media la salida del hemo desde este compartimento al citosol<sup>109</sup>. El transportador ABCG5, de la familia de los transportadores ABC, desempeña probablemente un papel en este punto, ya que se ha demostrado que participa en el tráfico del hemo procedente de la hemoglobina a la mitocondria, sin afectar al tráfico del hemo libre<sup>158</sup>.

### 3. Transportadores ABC mitocondriales

---

#### 3.1 Transportadores ABC

Los transportadores de membrana dependientes de ATP, también conocidos como transportadores ABC (ATP-Binding Cassette), constituyen una superfamilia de proteínas que actúan como transportadores activos primarios. Son proteínas altamente conservadas a lo largo de la evolución, encontrándose prácticamente en todos los organismos vivos desde procariotas hasta humanos<sup>159</sup>.

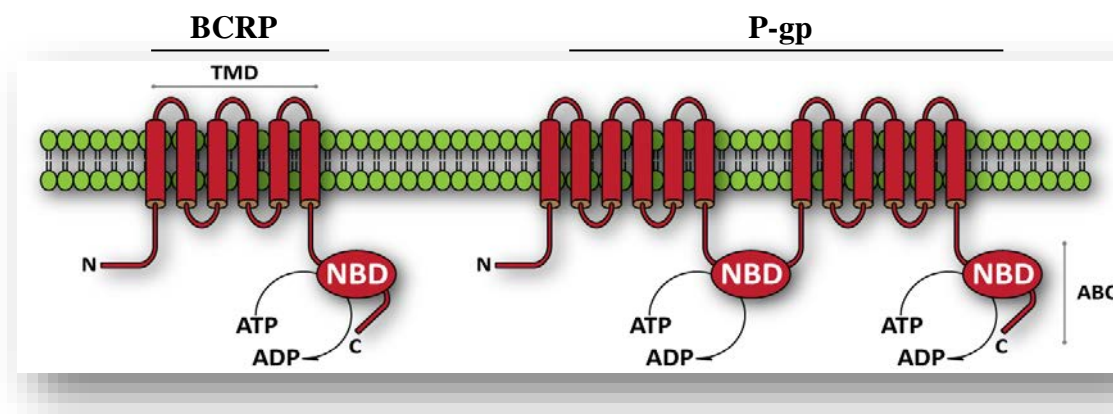
Los transportadores ABC utilizan la hidrólisis de ATP para translocar una amplia variedad de sustratos<sup>160</sup>. Estas proteínas están presentes en las membranas de diversos orgánulos, como el retículo endoplasmático, las mitocondrias, el aparato de golgi, los peroxisomas y los lisosomas<sup>161</sup>. Se pueden dividir en dos clases: i) ABCs exportadores cuya función sería mediar, por ejemplo, la extrusión de compuestos tóxicos (autodefensa), y ii) ABCs importadores participando principalmente en de diferentes compuestos<sup>162</sup>.

En los mamíferos, los transportadores ABC se expresan predominantemente en el hígado, el intestino, la barrera hematoencefálica, la placenta y el riñón<sup>163</sup>.

#### 3.2 Organización estructural y mecanismo de acción

La estructura típica de un transportador ABC está compuesta por dos **dominios transmembrana (TMD)** y dos **dominios de unión a nucleótidos (NBD)**. Hay varias disposiciones diferentes de los dominios TMD y NBD encontrados entre las proteínas ABC humanas (figura 20) pero en general, se construye un transportador funcional completo siguiendo la composición de TMD-NBD-TMD-NBD. Los cuatro dominios pueden estar presentes en un polipéptido, como la glicoproteína P o P-gp, ("**full-transporters**") o en dos proteínas separadas ("**half-transporters**"), en este último caso los transportadores ABC necesitan una dimerización específica para llevar a cabo su función, como ocurre en el caso de la proteína BCRP, la cual es codificada por el gen ABCG2 y sólo tiene 6 dominios transmembrana con un sitio de unión para el ATP. Los dos dominios NBD unen e hidrolizan el ATP, que proporciona la fuerza motriz para el transporte. Los dos TMD participan en el reconocimiento del sustrato y la translocación a través de la

membrana. Es decir, un medio transportador o half-transporter debe dimerizar con otro medio transportador para formar un transportador completo o full-transporters<sup>163</sup>, ya sea homodímero o heterodómero.



**Figura 20. Estructura química de los half-transporters (izda) y los full-transporters (dcha).** Tomada de<sup>163</sup>.

La característica principal de todas estas proteínas ABC son los NBDs. Estos dominios son hidrofílicos, citosólicos y presentan tres motivos muy conservados: el motivo Walker A, el motivo Walker B y el motivo C (también llamado motivo sello). Los motivos Walker A (GXXGXGKS/TS/T, donde X es cualquier aminoácido) y Walker B (h<sub>4</sub>DE/D, donde h corresponde a un residuo hidrofóbico) se encuentran en muchas ATPasas; el tercer dominio o motivo sello que lleva la secuencia consenso LSGGQ, es característica y exclusiva de las proteínas ABC. Los NBDs son las regiones más conservadas dentro de las proteínas ABC, alcanzando alrededor de un 30-40 % de identidad entre los distintos transportadores. La integridad de estos dominios es esencial para la función de los transportadores ya que se han descrito mutaciones en los NBDs de varios transportadores que inhiben su actividad. Los dominios transmembrana (TMD) están formados, cada uno, por varios segmentos hidrofóbicos. La mayoría consta 12 hélices con 6  $\alpha$ -hélices por monómero. El número de hélices transmembrana es variable y depende de la masa y la naturaleza química del sustrato que translocan. Esta región es la más divergente de los transportadores ABC y es la que determina la especificidad hacia el sustrato. La unión de dos TMD forma un canal que permite la translocación del sustrato a través de la membrana<sup>164-166</sup>. La interfase TMD-NBD es crucial para que la coordinación de



la unión con el sustrato, y su posterior translocación, está acoplada a la hidrólisis de ATP<sup>167,168</sup>.

Hasta la fecha, se han identificado 49 genes<sup>169</sup> que codifican para transportadores ABCs humanos, y se ha demostrado que son activos transcripcionalmente y que codifican proteínas funcionales. En base a sus homologías estructurales, los transportadores ABC se han subdividido en siete subfamilias que van desde ABCA hasta ABCG<sup>170,171</sup>.

Estas proteínas participan en numerosos procesos fisiológicos, como la homeostasis de esteroides, mecanismos inmunes y en el transporte de sustancias endógenas y exógenas como azúcares, aminoácidos, iones, péptidos y proteínas, así como un gran número de compuestos y metabolitos hidrofóbicos.

### **3.3 Transportadores ABC mitocondriales**

Las mitocondrias de la mayoría de las especies eucariotas albergan de 2 a 4 transportadores ABCs diferentes. En humanos, en concreto, se han descrito cuatro ABCs mitocondriales: **ABCB6**, **ABCB7**, **ABCB8** y **ABCB10**. Estas proteínas pertenecen a la subfamilia B, son half-transporters, contienen un dominio transmembrana N-terminal (TMD) y un dominio de unión a nucleótidos C-terminal (NBD), debiendo formar homodímeros para ser funcionales<sup>160</sup>.

Todos los transportadores de ABCB mitocondriales se han relacionado con estrés oxidativo y se caracterizan por estar involucrados en procesos biológicos de hierro y/o hemo. El hierro y el hemo son cofactores esenciales para muchas rutas biológicas, como la síntesis de clústeres de Fe/S, la fosforilación oxidativa en las mitocondrias y también la síntesis de ADN. La biosíntesis del hemo tiene lugar tanto en la mitocondria como en el citosol, lo que requiere una regulación estricta y el transporte de hierro, así como de intermediarios de porfirinas y hemo a través de la membrana mitocondrial<sup>172</sup>.

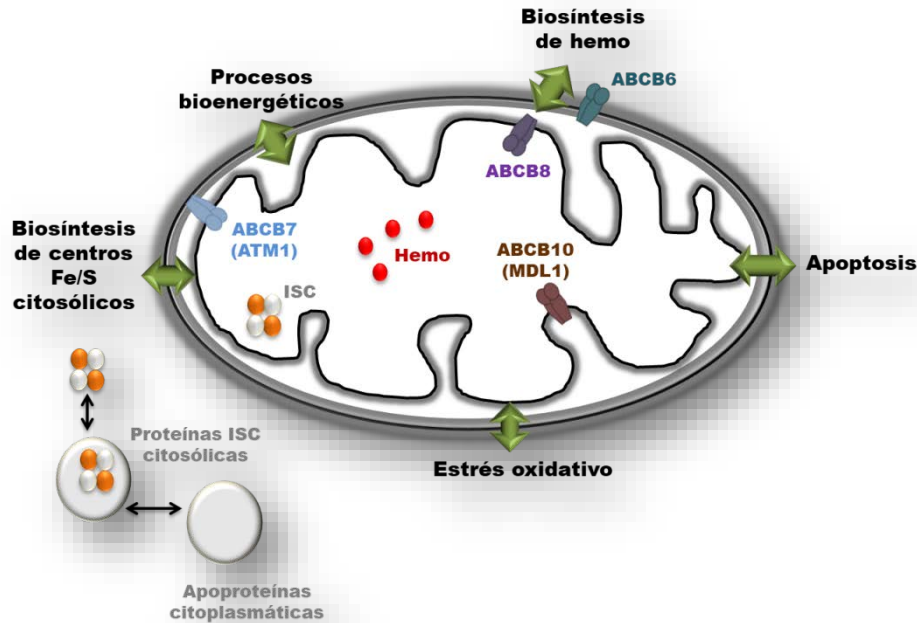


Figura 21. Transportadores ABCs mitocondriales<sup>173</sup>.

**ABCB6**, (MTABC3 en ratones) se localiza en la membrana mitocondrial externa, con los NBDs de cara al citosol, así como en la membrana plasmática, aparato de Golgi, retículo endoplasmático (ER) y también hay evidencias de una localización endolisosomal. Su función en cada uno de estos lugares ha sido fuente de mucha controversia. ABCB6 además tiene un TMD N-terminal adicional (TMD0), sin homología de secuencia con ninguna proteína conocida, implicado en su orientación endo-lisosomal<sup>174</sup>. ABCB6 se describió por primera vez como la proteína mitocondrial transportadora responsable de la entrada del coproporfirinógeno III durante la síntesis del hemo que tiene lugar en el interior de la mitocondria, y se ha demostrado que también es capaz de unirse a hemo y a la protoporfirina IX (PPIX). La importancia de ABCB6 en la biosíntesis del hemo de los glóbulos rojos fue respaldada por estudios realizados en ratones con el gen ABCB6 noqueado, sin embargo, la importancia solo se reveló en condiciones de estrés hematopoyético, ya que en condiciones normales, los ratones no mostraron ningún fenotipo aparente. Esto sugiere que durante la síntesis de porfirinas en condiciones normales, los glóbulos rojos pueden compensar la pérdida de ABCB6 por el aumento de la expresión de otros genes de síntesis de porfirinas y adquisición de hierro. Además, usando un modelo de ratón de porfiria, Fukuda y colaboradores demostraron que la pérdida de Abcb6 en combinación con una deficiencia en



ferroquelatasa dio como resultado un aumento en la acumulación de PPIX en los ratones<sup>172,175</sup>.

ABCB6 también se expresa en la membrana plasmática de eritocitos, y de hecho, es responsable de un nuevo grupo sanguíneo (Langereis, Lan). Las personas que carecen de ABCB6 (Lan-) no muestran ninguna consecuencia clínica, demostrando que esta proteína no es esencial para la eritopoyesis<sup>176</sup>. Muy recientemente se ha descrito que *Plasmodium falciparum* utiliza ABCB6 como receptor para infectar los eritrocitos, por lo que los glóbulos rojos de las personas con el grupo sanguíneo LAN<sup>-</sup> son altamente resistentes a la invasión por *P. falciparum* y, por lo tanto, no pueden infectarse por este parásito<sup>177</sup>.

El papel de ABCB6 en otros orgánulos sigue siendo desconocido. El hecho de que ABCB6 se encuentre en ER y Golgi puede simplemente reflejar su tránsito durante la biosíntesis y su presencia en la vía endolisosomal puede reflejar mecanismos para regular negativamente la exportación de porfirinas en la membrana plasmática o algún nivel de mitofagia donde las mitocondrias dañadas son degradadas por el lisosoma. No obstante, es necesario un estudio más exhaustivo para determinar si las otras localizaciones de ABCB6 son importantes en la homeostasis del hemo o las porfirinas<sup>172</sup>.

Por otra parte, también se ha demostrado que ABCB6 protege las células del estrés oxidativo. Debido a su capacidad para promover el incremento de concentraciones de hemo intracelulares, un posible mecanismo de protección es aumentar la cantidad de catalasa (enzima que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua), al proporcionar más hemo, ya que esta enzima utiliza como cofactor al grupo hemo. Además, se ha observado que la sobreexpresión de ABCB6 reduce la cantidad de especies reactivas de oxígeno citosólico (ROS) y protege frente al arsenito, que aumenta las ROS liberando hierro reactivo de la ferritina. Sin embargo, mientras que ABCB6 parece modular las ROS citosólicas, se desconoce si proporciona protección contra ROS en la mitocondria.

Varios estudios han asociado una mayor expresión de ABCB6 con resistencia a múltiples quimioterapéuticos. Sin embargo, estos hallazgos son difíciles de relacionar con la función de importación mitocondrial de hemo/porfirinas de



ABCB6. Es posible que ABCB6 localizado en la membrana plasmática, además de ser capaz de exportar porfirinas, también exporte agentes quimioterapéuticos. Además, también cabría la posibilidad de que ABCB6 localizado en la mitocondria pueda proteger de las ROS mediante la regulación de la biosíntesis de porfirinas, limitando la capacidad de los agentes quimioterapéuticos para inducir la formación de ROS mitocondriales y esto conduciría a mecanismos alternativos de resistencia a los medicamentos. No obstante, esto no se ha demostrado directamente y se necesitan más estudios para poder confirmarlo<sup>172</sup>.

En este sentido, también hay trabajos donde se ha descrito que la infección de *Leishmania* y el posterior tratamiento con antimoniales regula los niveles de varios genes implicados en la respuesta a fármacos en el macrófago, entre ellos el que codifica para ABCB6 (transportador de antimoniales). Esto, junto con otros mecanismos asociados directamente con la resistencia a fármacos en *Leishmania*, como la amplificación génica de enzimas que son diana sobre las que ejerce su actividad el fármaco o las mutaciones que alteran la función en las enzimas sobre las que actúa el compuesto<sup>178,179</sup>, provoca que los fallos terapéuticos en la leishmaniasis sean frecuentes en zonas endémicas.



Por último, cabe destacar la significativa similitud de ABCB6 con ATM1 en levaduras, proteína que como se detalla a continuación, tiene un papel imprescindible en la biosíntesis de clústeres Fe/S. ABCB6 puede complementar parcialmente el fenotipo de levadura  $\Delta$ ATM1, aunque como ABCB6 se localizan en membrana mitocondrial externa, importando a la mitocondria, y ATM1 esta en la membrana mitocondrial interna, exportando hacia el citosol, no se consideran homólogos funcionales.

**ABCB7:** La primera identificación de ABCB7 fue cuando se postuló como gen responsable de la anemia sideroblástica con ataxia ligada al cromosoma X (XLSA/A), una forma sindrómica asociada con ataxia espino-cerebelosa debida a mutaciones en este gen. Esto sugería un papel en los procesos biológicos de hierro/hemo. ABCB7 se localiza en la membrana mitocondrial interna y es esencial, ya que su interrupción es letal. Estudios han demostrado que reducciones en ABCB7 dan lugar a bajos niveles de hemo en el desarrollo de glóbulos rojos. Por otra parte, se ha demostrado

ABCB7 desempeña un papel en la biosíntesis del hemo como resultado de su interacción con la ferroquelatasa<sup>172</sup>.

El homólogo estructural y funcional de ABCB7 en levaduras (49% de identidad de secuencia) es ATM1, una proteína de 70 kDa que forma un complejo homodimérico en la membrana mitocondrial interna. Desempeña un papel fundamental en la biosíntesis de hemo y de los clústers Fe/S (introducción, apartado 4), así como en la homeostasis de hierro en general. Las levaduras que carecen de ATM1 sólo crecen en fuentes de carbono fermentables, probablemente porque tienen un defecto en la respiración y en el metabolismo del hemo. Dichas levaduras también muestran una acumulación 30 veces mayor de hierro mitocondrial y una disminución de los clústeres Fe/S citosólicos, mientras que los clústeres Fe/S mitocondriales no se ven afectados, por lo que se sugiere que ATM1/ABCB7 puede ser un exportador de un sustrato (no conocido) que contiene azufre (X-S) requerido para la formación de clústeres Fe-S citosólicos y nucleares<sup>180,181</sup>.

En 2014 se resolvió el cristal de ATM1 acoplado con glutatión. Los estudios estructurales demostraron que el glutatión se unía a ATM1 en un bolsillo con carga positiva y que el sitio de unión con el glutatión incluía un residuo mutado en XLSA/A. Por lo tanto, en mamíferos y levaduras, se ha propuesto que las proteínas tipo ABCB7/ATM1 transportan un complejo GSH-ISC o cualquier otra molécula que contenga azufre y GSH a través de la membrana interna mitocondrial que luego se transferirá a la maquinaria citosólica CIA<sup>182,183</sup>.

**ABCB8/MDL2:** La función de MDL2 en levaduras es desconocida. Se encuentra en la membrana mitocondrial interna y forma un complejo homodimérico de 300 kDa. Las levaduras deficientes en MDL2 muestran un crecimiento disminuido en los medios que contienen glicerol con respecto a las células de tipo silvestre. ABCB8 humano (M-ABC1 en ratones) forma un complejo con otras proteínas mitocondriales y no puede complementar la función ATM1.

**ABCB10/MDL1:** En levaduras MDL1 es un exportador homodimérico que se encuentra en la membrana mitocondrial interna. La delección de MDL1 no muestra ningún fenotipo, a pesar de que MDL1 puede restaurar parcialmente el fenotipo de células  $\Delta$ ATM1. ABCB10 humano (ABCB-me en ratones) complementa totalmente la

función de ATM1. Además, su función de transporte está relacionada con la biosíntesis del hemo, aunque se desconoce el sustrato exacto. Finalmente, ABCB10 podría facilitar la exportación de hemo desde la mitocondria<sup>173,184</sup>.

### 3.4 Transportadores ABC en *Leishmania*

El hecho de tratarse de proteínas altamente conservadas, junto con la utilización de herramientas bioinformáticas, ha permitido identificar 42 genes que codifican para proteínas ABC en *Leishmania* spp. Esto supone alrededor del 0.5% del total de los genes existentes en *L. major*. En *Trypanosoma brucei* y *Trypanosoma cruzi*, se han identificado 28 y 22 genes que codifican para proteínas ABC, respectivamente<sup>185</sup>.

Dependiendo de la homología en las secuencias de los dominios TMD y NBD, los transportadores ABC en *Leishmania* se agrupan en ocho subfamilias que van desde ABCA hasta ABCH, existiendo una subfamilia extra denominada como “otro”<sup>186</sup>. Muchos de ellos se han estudiado debido a su asociación con la resistencia a fármacos, que constituye uno de los problemas que obstaculizan el éxito del tratamiento terapéutico en la lucha contra el cáncer, las infecciones producidas por hongos patógenos o las enfermedades producidas por protozoos parásitos.



#### 3.4.1 Subfamilia ABCA

La subfamilia ABCA está integrada por diez miembros y están presentes en todos los genomas de las distintas especies de *Leishmania*. Cabe destacar ABCA4 (LABCA2), localizado en el bolsillo flagelar y en vesículas internas y ABCA8 (LABC1.1) localizado en el bolsillo flagelar y membrana plasmática. Ambos caracterizados en *L. tropica* e implicados en el tráfico de fofolípidos. Sin embargo, la sobreexpresión de estos transportadores no confiere resistencia a fármacos<sup>187,188</sup>.

#### 3.4.2 Subfamilia ABCB

La constituyen cuatro miembros, dos transportadores completos (ABCB4/LMDR1 y ABCB2/LMDR2) y dos hemi-transportadores (ABCB8/ABCB10/LABCB1 y ABCB6/ABCB7/LABCB3). ABCB4/LMDR1 fue el primer gen identificado en *Leishmania* que presentaba homología con la

glicoproteína-P/ABCB1/MDR1 de mamíferos. Debido a su fenotipo de multirresistencia a fármacos (MDR), confiere resistencia a fármacos de estructura y función muy diferentes como la vinblastina, puromicina, y a análogos de fosfolípidos como la miltefosina o la edelfosina<sup>71</sup>. ABCB2/LaMDR2, caracterizada inicialmente en *L. amazonensis*, confiere resistencia 5-fluorouracilo, un potente antimetabolito utilizado en el tratamiento del cáncer, disminuyendo la acumulación de este y sugiriendo por lo tanto, su implicación en la extrusión de xenobióticos<sup>189</sup>.

Al inicio de esta tesis doctoral, nada se sabía acerca de la función de LABCB1 y LABCB3. Hemos demostrado que LABCB1 presenta una localización mitocondrial, y resultados preliminares demuestran que a diferencia de su homólogo en *T. brucei* (tbATM1)<sup>190</sup>, es incapaz de restaurar el crecimiento de levaduras carentes del gen MDL2. Se ha sugerido que TbMdl es un candidato para la importación mitocondrial de hemo b y también que desempeña un papel clave en la biosíntesis de hemo, lo que afecta la homeostasis global del hemo en *T. brucei*<sup>190</sup>, sin embargo, la función de LmABCB1, aún está por descifrar.

Por otra parte, como se verá posteriormente, hemos demostrado que LABCB3 desempeña un papel principal en la biogénesis de los ISC citosólicos, ya que complementa el severo defecto de crecimiento en levaduras carentes de ATM1. Además, interactúa con porfirinas y se requiere para la síntesis mitocondrial del hemo a partir de un precursor del hospedador<sup>148</sup>. La caracterización de LmABCB3, será ampliamente desarrollada en el bloque I de los resultados de esta tesis doctoral.

### 3.4.3 Subfamilia ABCC

El primer gen de esta subfamilia caracterizado en *Leishmania* fue ABCC3 (PGPA/MRPA)<sup>191</sup>. ABCC3 se encuentra frecuentemente amplificado en líneas de *L. major* resistentes a antimoniales y a arsenito. Esta proteína se localiza en la membrana de vesículas intracelulares que se encuentran próximas al bolsilloflagelar, sugiriendo que la resistencia a metales proviene del secuestro de conjugados metal-tiol. Otros transportadores de esta subfamilia cuyo fenotipo ha sido asociado con resistencia a antimoniales en líneas con alto contenido en tioles, son ABCC4, ABCC5 y ABCC6<sup>192</sup>.

En *T. brucei*, la sobreexpresión del transportador TbABCC2, localizado en la membrana plasmática, confiere resistencia a melarsoprol. Por otra parte, la sobreexpresión de TbABCC6, localizado en vesículas próximas al bolsillo flagelar, no altera la sensibilidad de los parásitos al melarsoprol pero si aumenta la resistencia a la suramina<sup>193,194</sup>.

#### 3.4.4 Subfamilia ABCG

Seis transportadores pertenecientes a esta subfamilia han sido descritos en *Leishmania*; en *T. brucei*, sólo cuatro.

LABCG4 y LABCG6 destacan por tener funciones relacionadas con el transporte de fofolípidos. La sobreexpresión de estas proteína, confiere una resistencia significativa a miltefosina, edelfosina y perifosina, así como también a sitamaquina, en el caso de LABCG4 y a camptotecina, miltefosina, sitamaquina y cloroquina en el caso de LABCG6. Ambas proteínas se localizan en la membrana plasmática y en el bolsillo flagelar de los parásitos<sup>72,73</sup>. LABCG2 y LABCG5 se localizan en vesículas intracelulares próximas al bolsillo flagelar. LABCG2 está implicado en la translocación de fosfatidilserina a la cara externa de la membrana plasmática, afectando a su vez a la virulencia de los parásitos; LABCG5, por su parte, está implicado en el transporte intracelular de hemo<sup>158,195</sup>. Recientemente, se ha descrito que los transportadores LABCG1 y LABCG2 de *Leishmania* están implicados en la virulencia y el estrés oxidativo. En este estudio se sugiere que los transportadores LABCG1-2 podrían considerarse transportadores de fosfatidilserina y tioles no proteicos, junto con otras moléculas que están involucradas en el estrés oxidativo, la autofagia, la metacicloogénesis y los procesos de infectividad<sup>58</sup>.



En *Leishmania*, además, existe un grupo de genes que codifican para proteínas ABC que se encuentran sin clasificar entre las subfamilias establecidas. Es el caso del grupo de transportadores ABCI. En esta subfamilia existen cuatro transportadores: ABCI1, ABCI2, ABCI3 y ABCI4, los cuales no presentan homología con otros transportadores de mamíferos, siendo por lo tanto, específicos de tripanosomátidos. ABCI2, únicamente se halla en *Leishmania*. ABCI4 está involucrado en el eflujo de metales pesados asociados con tioles en *L. major*<sup>57</sup>. Por

último, recientemente se ha descrito ABCI3, un nuevo transportador ABC mitocondrial en *L. major*, cuya función aún no ha sido establecida pero con un papel importante en la resistencia al antimonio<sup>196</sup>.

#### 4. Biogénesis de Clústeres Fe/S

---

Los clústeres Fe/S (ISC, por Iron-Sulfur Clusters) son cofactores que representan uno de los catalizadores más antiguos en la evolución de las biomoléculas. Las características fisicoquímicas únicas de los clústeres Fe/S les confiere a las proteínas la capacidad de intervenir en una diversidad de procesos celulares tanto en organismos procariotas como eucariotas.

En primer lugar, los clústeres de Fe/S median la transferencia de electrones gracias a su capacidad de alcanzar una amplia variedad de estados de reducción. En segundo lugar, participan en la catálisis redox porque alcanzan potenciales de reducción muy bajos, aunque también pueden intervenir en la catálisis no redox actuando como ácido de Lewis. Algunas de las enzimas que actúan como ácidos de Lewis son las deshidratasas: aconitasa, fumarasa, isopropilmalto isomerasa y dihidroxiácido deshidratasa entre otras enzimas redox. Por último, los clústeres Fe/S pueden actuar como sensores de las condiciones ambientales y además, pueden participar en la estabilización de estructuras proteicas<sup>197</sup>.

Las mitocondrias de los eucariotas han heredado la maquinaria ISC de sus ancestros endosimbióticos las  $\alpha$ -proteobacterias<sup>198,199</sup> y *Saccharomyces cerevisiae* ha servido como organismo modelo para el estudio detallado de la biosíntesis de proteínas Fe/S. A pesar de las diferencias entre los sistemas de bacterias y eucariotas, existen principios básicos que subyacen a la síntesis *in vivo* de los clústeres Fe/S y el ensamblaje en apoproteínas.

El ensamblaje de los clústeres Fe/S comienza en la mitocondria, mediante el **importe de hierro** libre en su forma reducida, Fe<sup>2+</sup>. El potencial de membrana y las proteínas de la membrana mitocondrial interna Mrs3 y Mrs4 son esenciales para este paso en *S. cerevisiae*<sup>200</sup>. En *T. brucei*, la proteína mitocondrial TbMCP17, situada en la membrana mitocondrial interna, posiblemente esté funcionando como importador de hierro<sup>201</sup>.

La **biogénesis mitocondrial** implica tres pasos centrales. En un primer lugar, se produce la síntesis del cluster  $[2Fe-2S]$ , el cual tiene lugar en la proteína de andamiaje Isu1, que trabaja como una plataforma de ensamblaje en un proceso que involucra al complejo Nfs1-Isd11cisteín desulfurasa como donante de azufre. El mecanismo preciso en el que el hierro se une a la proteína de andamiaje Isu1 sigue sin estar claro, aunque la asociación con la frataxina (proteína de unión a hierro) es evidente<sup>202,203</sup>. Seguidamente, el clúster Fe/S se libera de la proteína de andamiaje Isu1 y se resuelve la asociación temporal con las proteínas de transferencia. El clúster liberado puede transportarse a las apoproteínas directamente, o por medio del monotiol glutaredoxina mitocondrial, Grx5<sup>203</sup>. Recientemente se ha descrito una interacción única de Grx5 y Ssq1, lo que muestra su participación vital en la maduración celular de todas las proteínas Fe/S<sup>204</sup>. Por último, el clúster Fe/S se transfiere e inserta a apoproteínas específicas.

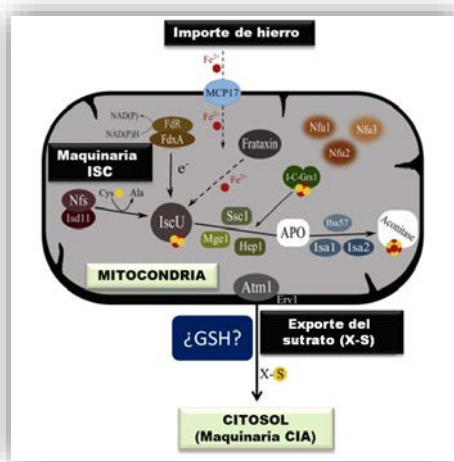


Figura 22. Biosíntesis de la maquinaria Fe/S en *T. brucei*<sup>205</sup>.

Para la biogénesis de clústeres Fe/S fuera de la mitocondria, se lleva a cabo el **exporte del sustrato que contiene azufre (X-S)** desde la mitocondrial hacia el citosol. El transporte es llevado a cabo por Atm1, una proteína perteneciente a la superfamilia de transportadores ABC de la que se ha hablado en el apartado anterior, y que se encuentra localizada en la membrana mitocondrial interna. Además de Atm1, para llevar a cabo el transporte también se requiere la sulfhidrilo- oxidasa Erv1, localizada en el espacio intermembranal<sup>206</sup>. Se ha sugerido que los ISC ensamblados en mitocondrias se coordinan con glutatión (GSH) para formar un complejo GSH-

ISC, el cual se exporta desde las mitocondrias a través de Atm1<sup>202,203</sup>, sin embargo, la naturaleza del compuesto que contiene azufreno se conoce con certeza. A continuación, la **maquinaria de ensamblaje ISC citosólico (CIA)** utiliza este producto de exportación mitocondrial para el ensamblaje de proteínas de hierro/azufre citosólicas y nucleares, las cuales, incluyen componentes esenciales de la traducción de proteínas, síntesis y reparación del ADN, por lo tanto, son esenciales para la viabilidad de la levadura y de las células humanas<sup>207</sup>.

Tanto el ISC mitocondrial como los mecanismos de la CIA citosólica están bastante conservados en los parásitos tripanosomátidos<sup>205</sup>.

## **5. Autofagia en tripanosomátidos**

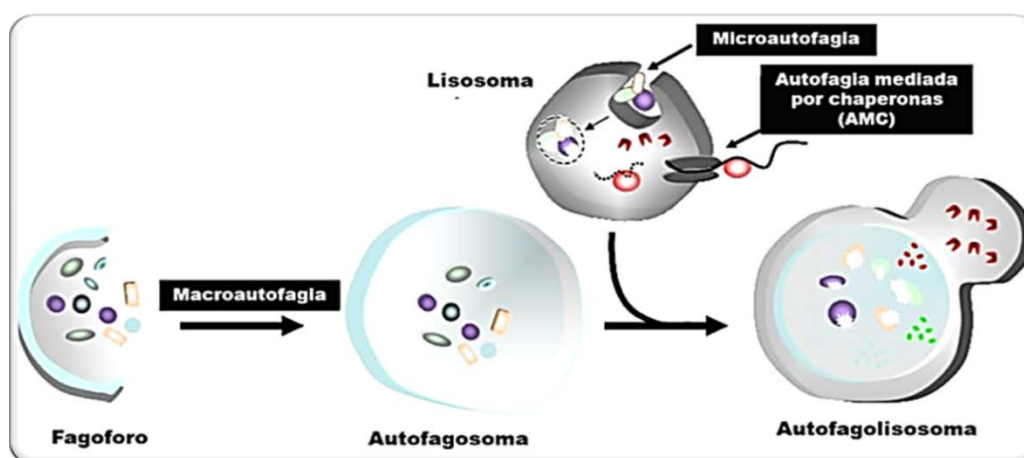
---

La palabra autofagia fue acuñada por Christian de Duve en 1963, para definir el proceso por el cual las células pueden degradar sus propias proteínas. Previamente, de Duve había descubierto la presencia de lisosomas en células de mamíferos, orgánulos con una matriz ácida que contiene un gran número de hidrolasas responsables de la degradación intracelular de proteínas y otras macromoléculas<sup>22</sup>. Sin embargo, la mayor parte del conocimiento actual sobre autofagia se ha adquirido en la última década, particularmente mediante un estudio genético, molecular y celular intensivo llevado a cabo en *S. cerevisiae*. Se han identificado más de 30 genes ATG (relacionados con AuTofaGia) y, para muchos de ellos, se han realizado estudios moleculares y funcionales, gracias a la fácil manipulación de estos organismos<sup>208</sup>.

La eliminación de organelos redundantes o dañados es una de las funciones de la autofagia, así como la eliminación de células dañadas o el mecanismo de supervivencia bajo inanición reciclando constituyentes citoplásmicos, ayudando a la supervivencia celular bajo otras condiciones de estrés como hipoxia y alta temperaturas, remodelando la morfología y/o maquinaria metabólica de la célula durante los cambios nutricionales o la diferenciación del desarrollo, e incluso la muerte celular dependiente de la autofagia.



La autofagia puede subclasificarse en tres tipos diferentes según el mecanismo por el cual el lisosoma degrada el material intracelular **macroautofagia**, **microautofagia** y **autofagia mediada por chaperonas** (figura 23), siendo la **macroautofagia** la más común. También existen otros procesos selectivos parecidos a la autofagia en los cuales se produce la degradación selectiva de organelos redundantes o dañados: pexofagia (peroxisomas), mitofagia (mitocondrias), reticulofagia o refagia (retículo endoplásmico), ribofagia (ribosomas), entre otros.



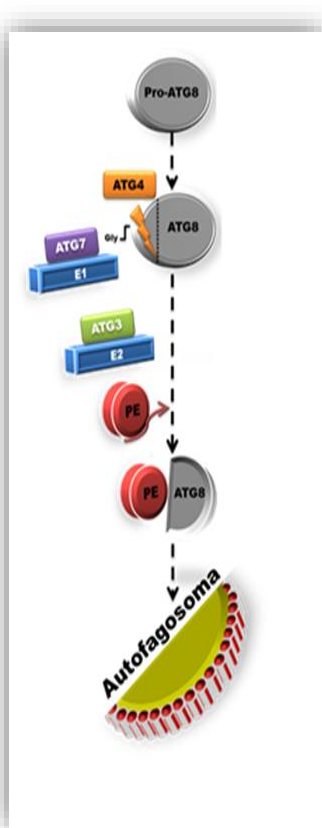
**Figura 23. Tipos de Autofagia.** 1) La macroautofagia se inicia con la formación de un fagóforo, que luego agrega membranas adicionales a través de mecanismos poco claros y forma una membrana limitante. Esta secuestra porciones del citosol destinadas a degradación y eventualmente se sella sobre sí misma para formar un autofosoma de doble pared. La degradación del contenido ocurre vía la fusión del autofosoma con el lisosoma. 2) En la microautofagia la degradación ocurre a través de la membrana lisosomal. 3) En la AMC, las proteínas con motivo KFERQ, son reconocidas por la chaperona citosólico hsc70 y dirigidas al lisosoma<sup>209</sup>.

La **macroautofagia** es un proceso no selectivo en el que las proteínas ATG se concentran en una estructura llamada PAS o *Pre-Autophagosomal*. Una membrana de aislamiento se forma al azar alrededor de porciones de citoplasma y otros componentes citoplásmicos tales como proteínas y orgánulos. La membrana de aislamiento se expande y se cierra para formar una vesícula de doble membrana, el **autofosoma**. Esta estructura carece de un ambiente ácido y de las enzimas requeridas para la digestión terminal del contenido engullido, por lo que finalmente se fusiona con el lisosoma (o con la membrana vacuolar en el caso de las levaduras), formando el **autofagolisosoma**. El resultado son moléculas que finalmente se

liberan hacia el citosol para la resíntesis de diferentes componentes intracelulares. La vesícula de membrana única que se encuentra dentro del lisosoma se denomina **cuerpo autofágico**<sup>210</sup>.

Independientemente de las condiciones que causan la necesidad de degradación de los componentes citoplásmicos, la autofagia en cualquier célula sigue un patrón desde su inducción hasta la entrega del blanco al orgánulo degradativo.

La biogénesis de la membrana requerida para la formación del autofagosoma en mamíferos y levaduras requiere el funcionamiento de dos vías de conjugación;



aquellas que implican **ATG8** y **ATG12/ATG5**. ATG8 se sintetizan como un precursor inactivo, y luego se activa mediante la eliminación de un aminoácido en el extremo C-terminal, por la cisteína-peptidasa **ATG4**, para dejar un residuo de glicina en el extremo C-terminal. La glicina expuesta es activada por **ATG7**, una enzima de tipo E1 (activadora de ubiquitina), transferida a **ATG3**, enzima tipo E2 (cataliza la conjugación de la ubiquitina), y finalmente conjugada con **fosfatidiletanolamina (PE)**. PE ancla ATG8 a la membrana autofagosomal y las moléculas adyacentes a ATG8 se unen y así median en la formación de un autofagosoma (figura 24). Los ATG8 se desconjugan de la PE antes de que éstos ingresen al sistema endosomal en células de mamífero o en la vacuola de levadura.

**Figura 24. Sistema de conjugación de ATG8**

ATG4 también media en esta desconjugación. Funciona en dos etapas durante la biogénesis y degradación del autofagosoma. La ausencia de ATG8 niega la función de las proteínas de la maquinaria central, y las estructuras pequeñas de tipo autofagosoma se producen en células nulas ATG8 de levadura (designadas

atg8Δ). Sin embargo, el tamaño del autofagosoma y el nivel de autofagia están regulados por la cantidad de Atg8 en células de levadura<sup>211</sup>.

Las formas sanguíneas de *T. brucei* obtienen su energía a través de la glucólisis, por lo que las alteraciones que provoquen una localización errónea de las enzimas glicolíticas, son altamente nocivas y provocan la muerte de los parásitos. Las formas procíclicas, sin embargo, presentan un metabolismo basado en la oxidación de aminoácidos como la prolina, mientras que la glucosa está presente sólo de manera ocasional. De acuerdo con estos cambios, el contenido enzimático de los glicosomas cambia considerablemente, con una regulación negativa de la glucólisis y una regulación positiva de otras vías. La autofagia participa en esta remodelación del número, tamaño y contenido enzimático de los glicosomas durante el desarrollo del parásito. El hecho de que los glicosomas se acumulen en el lisosoma y se rodeen de él, sugiere un proceso similar a la micropexofagia<sup>58</sup>. Esta última observación ha sido respaldada por un análisis bioinformático, ya que ortólogos de la mayoría de las proteínas ATG que están específicamente involucradas en la micropexofagia en *S. cerevisiae* están presentes en *T. brucei*<sup>208</sup>.



Al contrario de lo que se ha descrito para *T. brucei*, los datos disponibles sugieren que la reprogramación metabólica requerida durante la diferenciación de promastigotes a amastigotes no implica aumento del recambio de glicosomas por pexofagia en *Leishmania*. La pexofagia puede estar más involucrada en un ajuste del número de glicosomas, asociado con la dramática disminución del tamaño celular durante esta etapa de diferenciación. Por otra parte, se ha demostrado que el recambio proteico por macroautofagia es esencial para la metaciclologénesis (diferenciación de promastigotes procíclicos en promastigotes metacíclicos altamente infectivos) y también para la diferenciación de promastigotes metacíclicos en amastigotes.

Para el marcador de autofagosomas ATG8, se identificaron varios genes en cada uno de los tripanosomátidos: i) para *T. brucei* se identificaron tres; ATG8.1 y ATG8.2 que son muy similares y que están relacionados con ATG8/LC3 humano, y ATG8.3 que es más distante y cuya función, sigue sin estar clara. Éste último, es el ortólogo sinténico de LmjF22.1300 (proteína que, a pesar de algunas características similares a ATG8, funciona como *L. major* ATG12); ii) dos para *T. cruzi*: ATG8.1 que

se considera un "verdadero ATG8" y ATG8.2 que no parece participar en la autofagia y iii) cuatro familias de ATG8 en *Leishmania* (ATG8, ATG8.A, ATG8.B y ATG8. C) que comprenden en total 25 genes para *L. major*<sup>208</sup>. Juntas, las diferentes familias pueden cumplir la acción de ATG8 en levadura, pero sólo LmATG8 muestra una gran similitud con la ATG8 de levaduras y de ATG8 de mamíferos, por eso, se ha utilizado con éxito para marcar autofagosomas. LmATG8.A también parece localizarse en autofagosomas en las formas promastigotes, pero participa únicamente en la autofagia inducida por la inanición, mientras que LmATG8.B y LmATG8.C parecen no estar implicados en la autofagia. Curiosamente, además de las cuatro familias ATG8, *L. major* también presenta una proteína tipo ATG8 con una extensión C-terminal después del residuo de glicina, el cual es esencial para la conjugación con ATG5. Aunque esta proteína se alinea con ATG8 en un análisis filogenético, se llamó LmATG12 porque contiene una inserción de 58 residuos que la hace bastante similar a ATG12 de levaduras y de mamíferos, y se comportó como ATG12 en los estudios de complementación de levadura<sup>211</sup>.

En *T. brucei*, en condiciones de privación de nutrientes o inducción de la diferenciación, tanto TbATG8.1 como TbATG8.2 se concentran en estructuras punteadas que recuerdan a los autofagosomas. Sin embargo, TbATG8.1 y TbATG8.2 parecen no ser totalmente equivalentes. El agotamiento de TbATG8.1 no causa efectos detectables en el reclutamiento de TbATG8.2 a los autofagosomas, mientras que el agotamiento de TbAtg8.2 reduce significativamente la localización de los autofagosomas de TbAtg8.1.

*T. brucei* también contiene dos homólogos de ATG4 (TbATG4.1 y TbATG4.2). Al acoplar TbATG8.2 a un modelo de homología de TbATG4.1 (el que tiene mayor identidad de secuencia con ATG4 humano), la estructura general resulta muy parecida y la tríada catalítica necesaria está bien conservada en TbATG4.1, sugiriendo fuertemente conservación de la función<sup>208</sup>.

Por otra parte, se ha demostrado que el proceso de autofagia también se puede inducir en tripanosomas africanos mediante la adición de diferentes moléculas al medio, como la dihidroxiacetona (DHA). Los tripanosomas, no pueden metabolizar DHA ya que carecen de la DHA quinasa, por lo que esta sustancia se vuelve tóxica y causa inhibición del crecimiento de las formas sanguíneas de *T.*

*brucei*, así como alteraciones morfológicas tales como aumento de las estructuras vesiculares dentro del citosol, y la presencia de cuerpos multivesiculares, estructuras similares a mielina, vacuolas tipo autofagia, entre otras.

Delgado y colaboradores, mostraron que algunos neuropéptidos pueden ser endocitados por las formas sanguíneas de *T. brucei*, induciendo la autofagia en los parásitos. Los neuropéptidos endocitados alcanzan el lisosoma, alterando la integridad de éste y provocando la acumulación citosólica de enzimas glucolíticas<sup>212</sup>.

## 6. Péptidos antimicrobianos

---

El creciente número de resistencias a antibióticos así como a la ausencia de nuevos ha puesto de manifiesto la urgente necesidad de identificar nuevos compuestos con actividad microbicida. En este sentido los péptidos antimicrobianos (AMPs) se han revelado como una potente fuente de antimicrobianos siendo numerosos los grupos de investigación que están trabajando actualmente en su identificación y caracterización. Los AMPs están constituidos por un grupo heterogéneo de péptidos de tamaño variable (desde unos pocos aminoácidos a más de cien) y que pueden ser activos frente a un amplio grupo de organismos que abarca desde virus hasta parásitos pasando por bacterias y hongos. Desde el punto de vista bioquímico-estructural son muy diversos pero en general suelen estar organizados en hélices- $\alpha$  o laminas- $\beta$ . Pueden ser catiónicos o aniónicos, hidrofóbicos, hidrofílicos o anfipáticos. En cuanto a su mecanismo de acción suelen ser péptidos activos a nivel de membrana aunque algunos también lo son a nivel intracelular.



En total, se han descubierto o sintetizado más de 5.000 AMPs. Los AMPs naturales se pueden encontrar tanto en procariotas como en eucariotas. En los animales, los AMPs se encuentran principalmente en los tejidos y órganos que están expuestos a patógenos transportados por el aire y se cree que es la primera línea de la defensa inmune innata contra virus, bacterias y hongos. Por lo tanto, los AMPs juegan un papel importante para detener la mayoría de las infecciones antes de que causen algún síntoma<sup>213</sup>.

### *Péptidos antivirales*

Los AMPs antivirales neutralizan los virus ya que pueden integrarse en envolturas virales y causar inestabilidad de la membrana, haciendo que los virus no puedan infectar las células del huésped. También pueden reducir la unión del virus a las células huésped. Por ejemplo, las **defensinas** se unen a las glicoproteínas víricas, lo que hace que el virus del herpes simple (VHS) no pueda unirse a la superficie de la células del huésped.

Además de la interrupción de las envolturas virales y el bloqueo de los receptores virales, algunos AMPs antivirales pueden evitar que las partículas virales ingresen a las células hospedadoras al ocupar receptores específicos en células de mamíferos<sup>213</sup>.

### *Péptidos antibacterianos*

Los AMPs antibacterianos son los más estudiados hasta la fecha y la mayoría de ellos son AMPs catiónicos, que se dirigen a las membranas de las células bacterianas y provocan la desintegración de la estructura de las bicapas lipídicas. La mayoría de estos AMPs también son anfipáticos con dominios hidrofílicos e hidrofóbicos. Tales estructuras les proporcionan la capacidad de unirse a los componentes lipídicos (región hidrofóbica) y a los grupos fosfolípidos (región hidrófila). Se ha demostrado que algunos AMPs, a bajas concentraciones, pueden matar bacterias sin cambiar la integridad de la membrana, ya que en lugar de interactuar directamente con la membrana, inhiben algunas vías importantes dentro de la célula, como la replicación del ADN o la síntesis de proteínas. Por ejemplo, la **buforina II** puede difundirse en las células y unirse al ADN y ARN sin dañar la membrana celular<sup>213</sup>.

### *Péptidos antifúngicos*

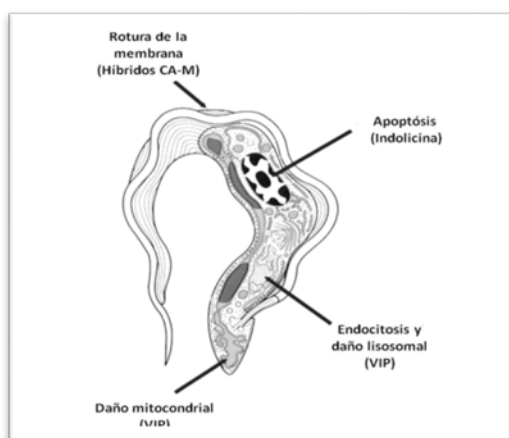
Al igual que los AMPs antibacterianos, los péptidos antifúngicos pueden matar hongos atacando la pared celular o los componentes intracelulares. Sin embargo, la membrana celular bacteriana y la pared celular de los hongos tienen diferentes contenidos. Por ejemplo, la quitina es uno de los principales componentes de las paredes celulares de los hongos y algunos de los péptidos antifúngicos son

capaces de unirse a la quitina. Tal capacidad de unión ayuda a los AMPs a atacar las células fúngicas de manera eficiente, ya que los AMPs pueden matar las células diana al alterar la integridad de las membranas fúngicas, aumentando la permeabilización de la membrana plasmática o formando poros directamente.

### *Péptidos antiparasitarios*

Los péptidos antiparasitarios representan un grupo más pequeño en comparación con otras las otras tres clases de AMPs. El mecanismo de acción mejor caracterizado es la alteración de la integridad de la membrana plasmática que produce desequilibrio osmótico, hinchazón celular y lisis. El mecanismo implica (i) colapso rápido del potencial de membrana y caída de los niveles intracelulares de ATP (ii) aumento constante de la permeabilidad de la membrana, y (iii) alteración morfológica. También se han descrito otros mecanismos que no implican daño grave de la membrana y que dependen del blanco de acción dentro del parásito, como son la apoptosis, daño mitocondrial o daño lisosomal<sup>213,214</sup>.

Por todo lo anterior podemos afirmar que los AMPs son sustancias con un gran potencial para uso clínico, debido a sus variados mecanismos de acción, amplio espectro de actividad y bajo potencial de resistencia. Sus mecanismos de acción son múltiples e incluyen interacciones con la membrana celular, inhibición de la síntesis proteica y de ácidos nucleicos, con funciones inmunomoduladoras, quimiotácticas y en el proceso de cicatrización<sup>215,216</sup>. Sin embargo, a pesar de las características ventajosas de los AMP, todavía existen algunos desafíos para sus aplicaciones, como la posible toxicidad para los humanos, la sensibilidad a las duras condiciones



ambientales (susceptibilidad a las proteasas y el pH extremo), la falta de selectividad frente a cepas específicas, los altos costos de producción, problemas de plegamiento de algunos AMP grandes, actividad reducida cuando se utiliza para revestimiento superficial y resistencia bacteriana de algunos AMP.

**Figura 25. Modos de acción y blancos de los AMPs en tripanosomátidos<sup>214</sup>.**

## 6.1 Bacteriocinas

A los AMPs producidos por bacterias se les llama de forma general bacteriocinas. Se trata de moléculas de síntesis ribosómica que pueden sufrir o no modificaciones postraduccionales y que en general presentan actividad antimicrobiana frente a microorganismos próximos a la cepa productora (salvo excepciones). Además, presentan una gran variabilidad en lo relativo al modo y espectro de acción, tamaño, origen genético y propiedades bioquímicas. Este tipo de sustancias han sido descritas prácticamente en todos los linajes del Dominio *Bacteria*, (también en *Archaea*) siendo frecuente la producción de diversos tipos de bacteriocinas entre cepas de una misma especie<sup>217</sup>.

Entre las bacteriocinas producidas por organismos del Dominio *Bacteria*, el grupo mejor estudiado es probablemente el de las bacterias lácticas<sup>218</sup>, por sus interesantes y variadas aplicaciones biotecnológicas. El espectro de acción que presentan es muy diverso: algunas inhiben únicamente el crecimiento de cepas relacionadas taxonómicamente con la cepa productora, como las **lactococinas A, B y M**, activas solamente frente a *Lactococcus*, otras en cambio, inhiben a un amplio rango de bacterias, en general Gram-positivas, ya sean patógenas, toxigénicas o saprófitas como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* o *Clostridium botulinum*<sup>219,220</sup>, frecuentemente encontradas en alimentos y de ahí el interés de su empleo como bioconservantes.

Por otro lado, también las hay que poseen un amplio espectro de acción que se extiende a bacterias Gram-negativas como la **enterocina AS-48** activa frente a *E. coli* o *Salmonella*<sup>221,222</sup> o la **nisina A** que abarca diversos géneros de importancia médica, como *Campylobacter*, *Haemophilus*, *Helicobacter* o *Neisseria*<sup>223</sup>.

En función de sus características, las bacteriocinas pueden ser clasificadas en tres clases principales que a su vez se dividen en varias subclases:

- La clase I está integrada por péptidos con un tamaño inferior a 10 kDa y que sufren algún proceso de modificación postraducional durante su biosíntesis. Algunos ejemplos son de esta clase son la nisina, subtilosina, microcinas o la enterocina AS-48.



- La clase II está formada por péptidos de tamaño inferior a 10 Kda y que no sufren ningún tipo de procesamiento postraducciona. Este es el caso de las pediocinas o de la lacticina Q.
- Tanto la clase I como la II están integradas por péptidos termoestables a diferencia de la clase III, que engloba péptidos de tamaño superior a 10 Kda y termolábiles<sup>218</sup>.

Uno de los grupos de bacteriocinas más interesante es el constituido por las bacteriocinas circulares. Se trata de péptidos formados por ciclos continuos de uniones peptídicas, y por tanto, carentes de extremos amino o carboxilo terminal. En general son péptidos/proteínas catiónicos y anfifílicos, con acción bactericida por acumulación o inserción en la membrana de las bacterias sensibles causando un incremento en la permeabilidad celular y pérdida de la función de barrera. Presentan una estructura tridimensional bien definida organizada en hélices  $\alpha$  conectadas por cortas regiones de giro, teniendo lugar la unión de los extremos dentro de una de estas hélices. Suelen presentar, una distribución asimétrica de las cargas positivas, de manera que los residuos básicos están localizados en algunas hélices mientras que los hidrofóbicos están en otras. Los residuos positivos se han visto necesarios para la atracción a la superficie de las bacterias por el fuerte momento dipolar que presentan, mientras que los hidrófobos serían los encargados de la inserción en ella<sup>224,225</sup>. La bacteriocina circular mejor caracterizada y conocida es sin lugar a dudas la enterocina AS-48.

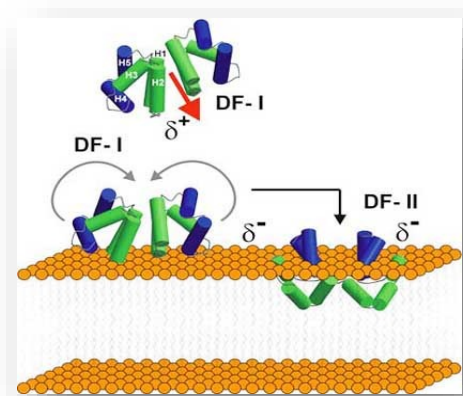


## 6.2 Enterocina AS-48

AS-48 es una bacteriocina circular de 7.4 Kda, producida por diferentes cepas de *Enterococcus faecalis* ssp. *liquefaciens* cepa S-48, reconocida como uno de los más efectivos y prometedores agentes antibacterianos, particularmente en alimentos donde ya se ha demostrado su importancia como bioconservante<sup>226</sup>.

La amplia actividad antimicrobiana de AS-48 se debe a su naturaleza anfipática y estructura cíclica. Esto le confiere una considerable estabilidad en amplios intervalos de pH, temperatura y también durante el almacenamiento, características que son de un valor inestimable para el desarrollo y la posible administración de esta molécula. La naturaleza anfipática derivada de la localización diferencial de las

carga en la molécula es fundamental en el mecanismo de acción<sup>227</sup>. Análisis cristalográficos llevados a cabo en AS-48, han permitido comprobar que se trata de una molécula mucho más flexible de lo esperado, capaz de adaptar su estructura a las condiciones ambientales. De hecho, AS-48 en el cristal se dispone formando dímeros que pueden ser de dos tipos, DF-I y DF-II, según las condiciones ambientales en las que se encuentran. Así, en medios acuosos las moléculas se disponen formando el dímero DF-I en el cual las hélices hidrófobas  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  interaccionan entre si, exponiendo a las hélices hidrófilas y cargadas al solvente. Sin



embargo, en ambientes hidrófobos, las moléculas de AS-48 forman los dímeros DF-II, gracias a la interacción entre las hélices hidrófilas  $\alpha_4$  y  $\alpha_5$  exponiendo las hidrófobas al solvente. Este cambio estructural se ha visto esencial en el mecanismo de acción (figura 26).

**Figura 26. Representación esquemática del mecanismo para la función molecular de AS-48.** El modelo incluye la aproximación de dímero DF-I a la membrana y la transición de DF-I a DF-II en la superficie de la membrana. Las hélices hidrofóbicas y polares se representan en verde y azul respectivamente. La flecha roja representa la dirección del momento dipolar intrínseco de DF-I<sup>225</sup>.

En relación al mecanismo de acción de AS-48, se ha propuesto que podría actuar sobre las membranas siguiendo el mecanismo de formación de poros molecular. Sin embargo, la existencia de los dos tipos de dímeros encontrados en los cristales de AS-48, han llevado a proponer un mecanismo molecular alternativo para explicar la actividad formadora de poros. Este modelo implica una transición de la forma soluble (DF-I) a la forma unida a la membrana (DF-II) permitiéndole así su inserción<sup>225</sup>. La inserción de numerosas moléculas de AS-48 en la membrana supondría una acumulación de cargas positivas en la misma, lo que podría desestabilizar el potencial de membrana y conducir a la electroporación molecular.

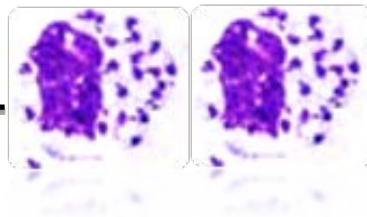
La enterocina AS-48 presenta actividad bactericida sobre la mayoría de las bacterias Gram-positivas ensayadas, siendo especialmente sensibles las especies de *Enterococcus*, *Listeria*, *Bacillus*, *Alicyclobacillus*, *Planococcus*, *Brochotrix*, *Clostridium*, *Mycobacterium*, *Corynebacterium* o *Nocardia*. Los tres últimos géneros, que tienen en común la presencia de ácidos micólicos en la pared celular, presentan mayor sensibilidad, tal vez por la naturaleza hidrófoba de esta estructura que facilitaría la unión y el acceso de AS-48 a su diana celular, la membrana citoplasmática. AS-48 afecta también a diversas especies de bacterias Gram-negativas, aunque éstas a concentraciones superiores debido al efecto protector de la membrana externa<sup>228</sup>.

En el capítulo II de esta tesis se muestran los resultados concernientes a la capacidad tripanocida de AS-48 frente a las formas sanguíneas de *T. brucei*. Durante la finalización de este estudio, Abengózar MÁ y colaboradores<sup>229</sup> han demostrado la potencialidad de AS-48 como leishmanicida, a concentraciones 1000 veces mayores de las requeridas en *T. brucei*, y actuando mediante un mecanismo de acción diferente.









---

## OBJETIVOS

---





Dada la toxicidad, la compleja administración y las resistencias clínica que presentan los tratamientos actuales frente a la Leishmaniasis y la Enfermedad del Sueño, existe la necesidad de desarrollar nuevos fármacos y estrategias que permitan prevenir o curar estas enfermedades.

En base a lo anterior, los objetivos generales de esta Tesis Doctoral han sido la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas en *Leishmania major* y la identificación de nuevos compuestos activos frente a *Trypanosoma brucei*. Para ello, los objetivos específicos son:

I. Búsqueda de nuevas dianas terapéuticas en *L.major*.

- Caracterización funcional de la proteína LmABCB3.
- Validación de LmABCB3 como diana terapéutica

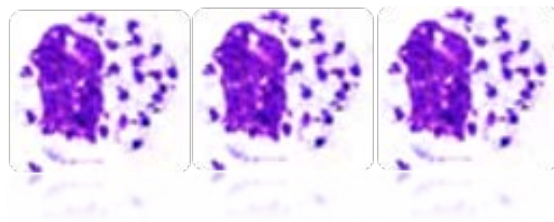
II. Identificación de nuevos compuestos activos frente a *T. brucei*.

- Estudio de la actividad tripanocida *in vitro* de la bacteriocina AS-48 y caracterización de su mecanismo de acción.
- Evaluación de la actividad tripanocida *in vitro* de distintos compuestos como: i) las quinoleínas sitamaquina y tafenoquina; ii) productos naturales, con especial atención a derivados del tirosol, hidroxitirosol, resveratrol, quercetina, curcumina y ácido gálico y iii) posibles ligandos de G-quadruplex (G4) del parásito.









## MATERIALES Y MÉTODOS



# I. MATERIALES

---

## 1. Líneas celulares y animales de experimentación

### 1.1 Cepas bacterianas

- ***Escherichia coli* DH5α:** F- Φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ- (GibcoBRL). Células competentes empleadas para la subclonación rutinaria de genes en vectores plasmídicos.
- ***Escherichia coli* XL-10 Gold®:** TetR Δ (mcrA) 183 Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr) 173 endA1 supE44 thi-1 recA-1 gyrA96 relAL lac The [F' *proAB lacIqZΔM15* Tn10 (TetR) Amy CamR]a (Agilent Technologies). Células ultracompetentes empleadas en la amplificación de plámidos modificados por mutagénesis dirigida.

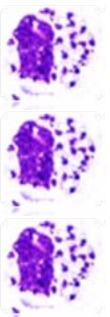
### 1.2 Levaduras

Las levaduras utilizadas pertenecen a la especie *Saccharomyces cerevisiae* y fueron cedidas por el Dr. David M. Koelle (Oregon Health & Science University, Portland, OR, USA). Ambas correspondientes a la cepa W303.

- **W303 ΔATM1:** (MATa,ade2,can1-100 leu2-3,112,trp1-1,ura3-1 his3-11,15 atm1:HIS3::ade4).
- **W303 ΔATM1 + ATM1:** (MATa,ade2,can1-100,his3-11,15,leu2-3,112,trp1-1,ura3- ,atm1:HIS3::ade4 [pMW114(URA3)]).

### 1.3 Parásitos

- ***Leishmania spp:*** La línea empleada en este trabajo fue *Leishmania major* (MHOM/IL/80/Friedlin), que se enmarca dentro las especies del género *Leishmania* que producen leishmaniasis cutánea
- ***Trypanosoma brucei brucei***(sanguíneos)monomórfica (S16), clon 221<sup>a</sup> derivado de Lister 427.
- ***Trypanosoma brucei rhodesiense*** (sanguíneos) (EATRO3 ETat1.2 TREU164).



- *Trypanosoma brucei gambiense* (sanguíneos) (cepa ELIANE).
- *Trypanosoma brucei brucei* (procíclicos) cepa 449.

#### 1.4 Células

- **THP1:** Línea celular monocítica humana derivada de una leucemia aguda (ATCC TIB-202).
- **MRC-5:** Línea celular humana. Fibroblastos derivados del tejido pulmonar.

#### 1.5 Ratones

Los ensayos de infección *in vivo* se realizaron en ratones machos C57BL/6 J (Charles River Breeding Laboratories), los cuales se mantuvieron en las instalaciones del Animalario de nuestro centro en condiciones libres de patógenos y de acuerdo a la normativa vigente.

### 2. Vectores de clonación y expresión

- **pGEM-T** (Promega): Vector que en su forma lineal posee un nucleósido de timidina en los extremos 3', los cuales actúan como extremos cohesivos con la cola de poli(A) resultante de la amplificación de fragmentos de ADN por PCR.
- **pENTR/D-TOPO** (Invitrogen): Vector que permite el clonaje de forma dirigida de productos de PCR entre dos sitios de recombinación concretos, utilizado en la tecnología Gateway.
- **pDR299:** Vector de expresión en levaduras. Cedido por el Dr. Olivier Cagnac (EEZ-CSIC).
- **Vectores pXG:** vector de expresión constitutiva para *Leishmania* spp. El gen puede presentar resistencia a higromicina B (*hph*) o a geneticina (G418) (*neo*).
- **Vectores pXG-/GFP+:** Vector de expresión constitutiva para *Leishmania major*, que permite crear proteínas de fusión a GFP en el extremo carboxilo terminal. Este vector posee el gen *neo*, que codifica la neomicina fosfotransferasa que confiere resistencia a geneticina (G418)<sup>230</sup>.



Los vectores pXG y pXG-/GFP de expresión en *Leishmania major*, fueron cedidos por el Dr. Stephen M. Beverley (Washington University, St Louis, MO, U.S.A).

- **Vector Plexsy-hygro2/mCherry:** Vector de expresión constitutiva integrativa para *Leishmania* spp. con el gen *hyg* que codifica la higromicina fosfotransferasa, que confiere resistencia a higromicina. Permite crear proteínas de fusión con la proteína mCherry en el extremo carboxilo terminal.
- **Vector p2T7TiCLH:** se transfectó en *T. b. brucei* S16 para generar las líneas celulares privadas en clatrina mediante interferencia de ARN (ARNi)<sup>231</sup>.

### 3. Medios de cultivo

#### 3.1 Medios de cultivo utilizados en bacterias

- **Medio LB:** Contiene 10 g de Bacto-Triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl en 1 L de agua bidestilada. Ajustar pH 7- 7,2 con NaOH. Esterilizado en autoclave. Para solidificar, añadir agar al 1,5 % (p/v) y una vez autoclavado, dejar enfriar (55°C), añadir antibiótico si fuera necesario y repartir en placas.



#### 3.2 Medios de cultivo utilizados en levaduras

- **Medio YPD/YPG:** Medio completo, compuesto por peptona 20 g/l, glucosa 20 g/l y extracto de levadura 10 g/l. Esterilizado en autoclave. De acuerdo con las necesidades del experimento a realizar, la glucosa se sustituyó por otras fuentes de carbono (fermentables o no fermentables): Galactosa: 3% (w/v), lactato: 2% (w/v), glicerol: 2% (v/v) o etanol: 2% (v/v). Para solidificar, añadir bacto-agar al 1,5% y una vez autoclavado, dejar enfriar (55°C) y repartir en placas.
- **Medio SC-Ura:** Medio mínimo, compuesto por Yeast Nitrogen Base without Aminoacids (Difco) 6,7 g/l, Yeast Synthetic Drop-out Medium Supplements without Uracil (Sigma-Aldrich) 1,87 g/l, MES (Sigma-Aldrich) 3,9 g/l. Se ajusta con NaOH pH a 5,7. Tras su esterilización en autoclave se suplementa

con glucosa al 2%. Para solidificar, añadir bacto-agar al 1,5% y una vez autoclavado, dejar enfriar (55°C) y repartir en placas.

- **Medio SC-Trip:** Medio mínimo, compuesto por Yeast Nitrogen Base without Aminoacids (Difco) 6,7 g/l, Yeast Synthetic Drop-out Medium Supplements without tryptophan (Sigma-Aldrich) 1,87 g/l, MES (Sigma-Aldrich) 3,9 g/l. Se ajusta con NaOH pH a 5,7. Tras su esterilización en autoclave se suplementa con glucosa al 2%. Para solidificar, añadir bacto-agar al 1,5% y una vez autoclavado, dejar enfriar (55°C) y repartir en placas.

### 3.3 Medios de cultivo utilizados en parásitos

- **RPMI modificado 1640:** Medio para el cultivo de las formas promastigotas de *L. major*. Se suplementa con 10 o 20% de hiFBS. Para la obtención de medio semisólido se añadió agar al 1%, mezclando para ello medio de cultivo 2X y agar al 2% fundido y adicionando antibiótico si fuera necesario.
- **HMI-9:** Medio de cultivo para las formas sanguíneas de *T. brucei*, suplementado con 10 % de hiFBS para *T. b. brucei* y con 20% de hiFBS para el caso de *T. b. gambiense* y *T. b. rhodesiense*.
- **SDM-79:** Medio de cultivo de las formas procíclicas de *T. brucei*, suplementado con 10 % de hiFBS y 7,5 µg/mL hemina.

### 3.4 Medios de cultivo utilizados en líneas celulares

- **RPMi 1640** para el cultivo de THP1. Se suplementa con 10% hiFBS, 2 mM de L-Glutamina y Penicilina/Estreptomicina.
- **DMEM** (alto en glucosa) para el cultivo de MRC-5. Se suplementa con 10% hiFBS 2 mM de L-Glutamina y Penicilina/Estreptomicina.

### 3.5 Suplemento para los medios de cultivo

- **Suero bovino fetal:** Debe ser inactivado por calor a 56°C durante 45 min.
- **Suero bovino fetal inactivado depletado de hemo:** Suero bovino fetal inactivado y filtrado por columnas Amicon Ultra 10.000 MWCO (Millipore, Carrigtwohill, Co. Cork, Ireland) para seleccionar la fracción de bajo peso molecular del suero, tal y como se describe en<sup>232</sup>.

## 4. Tampones, soluciones y reactivos

### 4.1 Tampones usados en los estudios funcionales con parásitos

- **Tampón HBS:** Contiene 137 mM NaCl; 5 mM KCl; 7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 6 mM glucosa y 20 mM HEPES a pH 7,4.
- **Tampón fosfato salino (PBS):** Contiene 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH 7,4.
- **PBS modificado de Voorheisv (vPBS):** PBS con sacarosa 46 mM y glucosa 10 mM.
- **Tampón de dilución de tripanosomas (TDB):** Contiene KCl 5 mM, NaCl 80 mM, MgSO<sub>4</sub> 1 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM, glucosa 20 mM; pH 7,4.

### 4.2 Tampones usados para electroforesis de ADN

- **Tampón de carga:** 0,25% azul de bromofenol; 0,25% xileno cianol y 30% glicerol.
- **Tampón TE:** 10 mM Tris-HCl pH 7,4; 1 mM EDTA.
- **Tampón de electroforesis de ácidos nucleicos (TAE 10X):** 0,4 M Tris; 10 mM EDTA; ácido acético glacial 11,42 mL para 1 L.



### 4.3 Tampones usados para la precipitación con hemina-agarosa

- **Tampón de solubilización:** 100 mM Kpi pH 7,4; 100 mM NaCl; 1% de dodecilmaltósido (DDM); 1 mM DTT y cóctel inhibidor de proteasas 10 µl/mL.
- **Tampón de dilución:** 100 mM Kpi pH 7,4; 150 mM NaCl; 1 mM hidrosulfito sódico y 1 mM PMSF.
- **Tampón de lavado:** 50 mM Ki pH 7,4; 150 mM NaCl; 0,1% Triton X-100 y 1 mM DTT.

### 4.4 Soluciones usadas para extracción de ADN genómico de *L. major*

- **Mezcla clorofórmica: cloroformo:** alcohol isoamílico en proporción 24:1.

- **Fenol:** el fenol destilado es saturado con Tris-HCl 0,1 M (pH 8). En el momento de usar se añade 8-hidroxiquinoleína hasta 0,1% y se almacena en -40°C para su conservación durante tiempos prolongados.

#### 4.5 Soluciones usadas para electroforesis de proteínas

- **Laemmli 5X:** 0,625 M Tris-HCl; pH 6,8; 10% SDS (p/v); 40% glicerol (p/v); 7,5 %  $\beta$ -mercaptoetanol (v/v); 1,5 % azul de bromofenol.
- **Acrilamida-bisacrilamida** (Bio-Rad).
- **Tampón separador:** 1,5 M Tris-HCl; 0,4% SDS; pH 8,8.
- **Tampón concentrador:** Tris-HCl 0,5 M; 0,4% SDS; pH 6,8.
- **Tampón de electroforesis SDS-PAGE:** 25 mM Tris; 250 mM glicina; 0,1% SDS.
- **Azul de Coomassie:** Ácido acético glacial 10 %, metanol 50% y 2 g/l de Coomassie Brilliant Blue (R-250).

#### 4.6 Soluciones usadas para Western Blot e Inmunodetección

- **Solución de transferencia:** 25 mM Tris base y 0,7 M glicina (para proteínas de membrana o muy hidrofóbicas). La eliminación de metanol en el tampón de transferencia para proteínas de membrana o muy hidrofóbicas, aumenta la eficiencia de la transferencia de éstas pero disminuye la afinidad a la membrana de nitrocelulosa.
- **Solución de bloqueo:** Leche desnatada en polvo al 5% en PBS.
- **Solución de inmunodetección:** BSA 0,1%, Tween-20 0,1% en PBS.
- **Solución de lavado:** Tween 20 0,1% en PBS.
- **Solución de rojo de Ponceau:** Rojo de Ponceau 0,5% en agua.

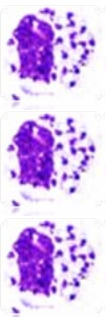
#### 4.7 Soluciones usadas para Southern Blot

- **Solución de despurinización:** 0,25 M HCl.
- **Solución de desnaturalización:** 0,5 M NaOH y 1,5 M NaCl.
- **Solución de neutralización:** 0,5 M Tris-HCl (pH 7,5) y 1,5 M NaCl.
- **20X SSC:** 3 M NaCl y 0,3 M citrato sódico, pH 7.

- **Solución de hibridación:** DIG Easy Hyb Granules, preparado según las instrucciones del fabricante.
- **Tampón de lavado:** Solución de ácido maleico pH 7,5 y 0,3% Tween 20.
- **Solución de bloqueo:** 10% de reactivo de bloqueo (Blocking Reagent-Roche) y 90% de solución de ácido maleico.
- **Solución de detección:** 0,1 M Tris-HCl y 0,1 M NaCl, pH 9,5.

## 5. Fármacos

- **Ampicilina:** Antibiótico betalactámico (fue la primera penicilina semisintética). Se utilizó en una concentración de 100 µg/mL para la selección de bacterias competentes transformadas con los plásmidos que contengan el gen de la  $\beta$ -lactamasa.
- **Kanamicina:** Antibiótico aminoglucosídico producido por *Streptomyces kanamyceticus*. Se utilizó en una concentración de 50 µg/mL para la selección de bacterias competentes transformadas con los plásmidos TOPO, que confiere resistencia a este fármaco.
- **Higromicina B:** Antibiótico aminoglucosídico producido por *Streptomyces hygroscopicus* y que es un inhibidor de la síntesis de proteínas. Se utilizó como fármaco para la selección de parásitos transfectados con el vector pXGHygro, el cual contiene el gen *hyh*, que codifica una quinasa que inactiva el fármaco a través de la fosforilación del mismo. Se utilizó en una concentración de 10-500 µg/mL en la selección de expresión de proteínas en *Leishmania* spp.
- **Geneticina (G418):** Antibiótico aminoglucosídico producido por *Micromonospora rhodorangea* que actúa como inhibidor de la síntesis de proteínas a nivel de la elongación polipeptídica. Se utilizó como fármaco para la selección de parásitos de *Leishmania* transfectados con los vectores que contenían el gen de la neomicina fosfotransferasa: pXGNeo y pXG GFP (el rango de concentración utilizado para la selección fue de 6-500 µg/mL).
- **Fleomicina:** Antibiótico metalo-glucopéptido de la familia de las bleomicinas, aislado de una cepa de *Streptomyces verticillus*. Provoca roturas en la cadena de ácidos nucleicos y altera la membrana plasmática. Se utilizó para el cultivo de las formas procíclicas de *T. brucei* 449 (1 µg/mL) y para la selección de las formas sanguíneas de *T. brucei* transfectados con pLew100



(2,5 µg/mL), que contienen el gen *Sh ble*, que codifica una proteína con alta afinidad de unión a la fleomicina, provocando su inhibición.

- **Doxociclina:** Se utilizó a una concentración de 5 µg/mL para la inducción de EGFP-ATG8.2 en el plásmido pLew100 y ARN interferente con el plásmido p2T7TiCLH.
- **Ácido 5-Fluoroorótico (FOA): Derivado fluorado del ácido orótico, precursor de pirimidina.** El 5-FOA es utilizado por levaduras que disponen de la ruta de síntesis de uracilo intacta produciendo un intermedio tóxico que les impide crecer. En este medio únicamente son capaces de crecer aquellas células auxótrofas para el uracilo, es decir, aquellas cepas que hayan perdido el plásmido que lleva el gen marcador URA3. Se utilizó en una concentración de 1mg/mL en medio SC-trip.

## 6. Anticuerpos

- **Anticuerpo policlonal anti-GFP de conejo:** Molecular Probes (Invitrogen).
- **Anticuerpo monoclonal anti-GST de ratón:** Molecular Probes (Invitrogen).
- **Anticuerpo anti- $\alpha$ -Tubulina:** Thermo Scientific.
- **Anticuerpo policlonal anti-AS-48 de conejo**<sup>233</sup>.
- **Anticuerpo monoclonal anti-VSG121 de ratón**<sup>234</sup>.

## 7. Oligonucleótidos

Tabla 4. Oligonucleótidos empleados para expresión en levaduras

Nombre del Oligonucleótido	Secuencia (5'→3')	Aplicación
TOPO ABCB3 Fw	<u>CCCCGGG</u> CACCCCGGGATGCTTGATTGCACCAT	Cebador directo para clonar LmABCB3 en pENTR™/SD/D-TOPO <sup>R</sup>
TOPO ABCB3 Rv	GCCATGTGTGGCAGCGGGCTC	Cebador inverso para clonar LmABCB3 en pENTR™/SD/D-TOPO <sup>R</sup>

Aparecen subrayadas las secuencias para las enzimas de restricción.

Tabla 5. Oligonucleótidos empleados para expresión en *Leishmania major*

Nombre del Oligonucleótido	Secuencia (5'→3')	Aplicación
ABCB3 Met1 Fw	<u>ACCCGGG</u> ATGTGGATCTGGCGGCACGTACG	Cebador directo para clonar LmABCB3 en pXG y pXG/GFP+
ABCB3 Met2 Fw	<u>CCCGGG</u> ATGCTTCGGCGAGGGACTCCGCTAC	Cebador directo para clonar LmABCB3 en pXG y pXG/GFP+
ABCB3 Met3 Fw	AATT <u>CCCGGG</u> ATGGGCGAGCGGGTGGCAGC	Cebador directo para clonar LmABCB3 en pXG y pXG/GFP+
LmABCB3 Fw	AATT <u>CCCGGG</u> ATGCTTGATTGCACCATGCTTCGGC	Cebador directo para clonar LmABCB3 en pXG y pXG/GFP+
LmABCB3 GFP Rv	AATT <u>GATATC</u> GCCATGTGTGGCAGCGGGCTC	Cebador inverso para clonar LmABCB3 (Met1, Met2, Met3 y LmABCB3) en pXG/GFP+



<b>LmABCB3 Rv</b>	AATT <u>GGATC</u> CTCAGCCATGTGTGGCAGCGGG	Cebador inverso para clonar LmABCB3 (Met1, Met2, Met3 y LmABCB3) en pXG
<b>UNE mcherry Fw</b>	<u>AGATCT</u> ATGCTTGATTGCACCATGCTTCGGC	Cebador directo para clonar LmUNE y LmUNE <sup>cys</sup> en pLEXSYhyg-mCherry
<b>UNE mcherry Rv</b>	AATT <u>GCTAGC</u> CTCATCGCCTGGGC	Cebador inverso para clonar LmUNE y LmUNE <sup>cys</sup> en pLEXSYhyg-mCherry
<b>GST Fw</b>	AACCGCTAGCATGTCCCTATACTAGGTTATTGGA	Cebador directo para clonar LmUNE Y LmUNE <sup>cys</sup> en pLEXSYhyg-GST
<b>GST Rv</b>	ATAAGAATGCGGCCGCTCAGTCACGATGAATTCCC GGGGAT	Cebador inverso para clonar LmUNE Y LmUNE <sup>cys</sup> en pLEXSYhyg-GST

Aparecen subrayadas las secuencias para las enzimas de restricción.

**Tabla 6. Oligonucleótidos empleados para construcciones de parásitos KO<sup>+/−</sup> en *Leishmania***

<b>Nombre del Oligonucleótido</b>	<b>Secuencia (5'→3')</b>	<b>Aplicación</b>
For5'UTRABCB3	TCATATGACCGCGTCGCAGGCTCACTG	Cebador directo para clonar 5'UTR KO LmABCB3
Rev5'UTRABCB3	GATTTAAATGAATTCTGCCGCTGCCACCCGCTCGCC	Cebador indirecto para clonar 5'UTR KO LmABCB3
For3'UTRABCB3	GATTTAAATTCTAGAAGCCCGCTGCCACACATGG	Cebador directo para clonar 3'UTR KO LmABCB3
Rev3'UTRABCB3	GAGTCGGATACGTCTCCTAGAACCAAGC	Cebador indirecto para clonar 3'UTR KO LmABCB3

Aparecen subrayadas las secuencias para las enzimas de restricción.



**Tabla 7. Oligonucleótidos empleados para la validación mediante PCR de parásitos KO<sup>+/−</sup> en *Leishmania***

Nombre del Oligonucleótido	Secuencia (5'→3')	Aplicación
P1	ACTTCGTCGTTTCCGCTGAACCGC	Cebador directo fuera de la UTR para confirmar KO LmABCB3
P2	AGCGACGGATGCGTGCCGAGCCCT	Cebador indirecto fuera de la UTR para confirmar KO LmABCB3
P3	AGCGACGGATGCGTGCCGAGCCCT	Cebador inverso dentro del gen para confirmar secuencia higromicina
P4	CACAGTTTGCCAGTGATACACATGG	Cebador inverso para confirmar secuencia higromicina

**Tabla 8. Oligonucleótidos empleados para la validación mediante Southern Blot de parásitos KO<sup>+/−</sup> en *Leishmania***

Nombre del Oligonucleótido	Secuencia (5'→3')	Aplicación
HYGROFWSB	ATGAAAAAGCCTGAACTCACC	Cebador directo para confirmar KO LmABCB3
HYGRORVSB	GTTATGCGGC CATTGTCC	Cebador inverso para confirmar KO LmABCB3
UTRSBABCB3FW	TAGTCAAATCCGGCTGTGGG	Cebador directo para confirmar KO LmABCB3
UTRSBABCB3RV	GCTGCCGTGG CCTATCTG	Cebador inverso para confirmar KO LmABCB3
ABCB3SBFW	GAGACCGGCGTCCTGAGCAAAG	Cebador directo para confirmar KO LmABCB3
ABCB3SBFW	GTGACGTTGCGCAGCTCGATGG	Cebador inverso para confirmar KO LmABCB3



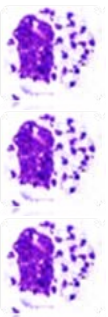
**Tabla 9. Oligonucleótidos empleados para mutagénesis dirigida**

<b>Nombre del Oligonucleótido</b>	<b>Secuencia (5'→3')</b>	<b>Aplicación</b>
ABCB3KM Fw	TCCGGGAGCGGCATGAGCACC ATCTTC	Cebador directo para reemplazar la lisina 675 por una metionina (K675/M) en la región Walker A de LmABCB3
ABCB3KM Rv	GAAGATGGTGCTCATGCCGCT CCCGGA	Cebador inverso para reemplazar la lisina 675 por una metionina (K675/M) en la región Walker A de LmABCB3
ABCB3XLSAFw	GCATGATTTACCGCGCGGTAC AGTCCAGCAC	Cebador directo para reemplazar el glutamato 597 por una alanina (E597/A) en LmABCB3
ABCB3XLSARv	GTGCTGGACTGTACCGCGCGG TAAATCATGC	Cebador inverso para reemplazar el glutamato 597 por una alanina (E597/A) en LmABCB3
ABCB3Cys1ALA Fw	GCACGCACGCTCGTGGCGATA TCCCGGCTGCTG	Cebador directo para reemplazar la cysteína 78 por una alanina (C78/A) en LmABCB3
ABCB3Cys1ALA Rv	CAGCAGCCGGGATATCGCCAC GAGCGTGCGTGC	Cebador inverso para reemplazar el cysteína 78 por una alanina (C78/A) en LmABCB3
ABCB3Cys2,3ALA Fw	GGAGTCTGAGAAGCGCACGGC GGGCGCCTCCGCGTAGATGA TCTACAAAAAGT	Cebador directo para reemplazar las cysteínas 105 y 106 por alaninas (C105,C106/A,A) en LmABCB3
ABCB3Cys2,3ALA Rv	ACTTTTTGTAGATCATCTACC GCGGAGGCGCCCGCGTGCGC TTCTCAGACTCC	Cebador inverso para reemplazar las cysteínas 105 y 106 por alaninas (C105,C106/A,A) en LmABCB3
ABCB3 MUTR479 Fw	TCGGTGACGAACTGGGCCTCG AAATTCGCAC	Cebador directo para reemplazar la arginina 479 por una alanina (R479/A) en LmABCB3
ABCB3 MUTR479 Rv	GTGCGGAATTTTCGAGGCCAG TTCGTCACCGA	Cebador inverso para reemplazar la arginina 479 por una alanina (R479/A) en LmABCB3
ABCB3 MUTR483 Fw	AACTGGCGCTCGAAATTCGCC ACGCGCTACAAC	Cebador directo para reemplazar la arginina 483 por una alanina (R483/A) en LmABCB3
ABCB3 MUTR483 Rv	GTTGTAGCGCGTGGCGAATTT CGAGCGCCAGTT	Cebador inverso para reemplazar la arginina 483 por una alanina (R483/A) en LmABCB3
ABCB3 MUTN542 Fw	CGATGGCGCTGCTGGCCTTTG GGCAGCAGC	Cebador directo para reemplazar la arparagina 542 por una alanina (N542/A) en LmABCB3

ABCB3 MUT N542 Rv	GCTGCTGCCCAAAGGCCAGCA GCGCCATCG	Cebador inverso para reemplazar la arparagina 542 por una alanina (N542/A) en LmABCB3
ABCB3 MUTS589 Fw	GCAGCTCTATATGCCGCTGGC CTACCTCGGCATGATTTACC	Cebador directo para reemplazar la serina 589 por una alanina (S589/A) en LmABCB3
ABCB3 MUTS589 Rv	GGTAAATCATGCCGAGGTAGG CCAGCGGCATATAGAGCTGC	Cebador inverso para reemplazar la serina 589 por una alanina (S589/A) en LmABCB3
ABCB3 MUTM593 Fw	CGCTGAGTTACCTCGGC <del>GCGA</del> TTTACCGCGAGGTAC	Cebador directo para reemplazar la metionina 593 por una alanina (M593/A) en LmABCB3
ABCB3 MUT M593Rv	GTACCTCGCGGTAAATCGCGC CGAGGTAACCTCAGCG	Cebador inverso para reemplazar la metionina 593 por una alanina (M593/A) en LmABCB3
ABCB3 MUT R596 Fw	TACCTCGGCATGATTTAC <del>GCC</del> GAGGTACAGTCCAG	Cebador directo para reemplazar la arginina 596 por una alanina (R596/A) en LmABCB3
ABCB3 MUT R596Rv	CTGGACTGTACCTCGGC <del>GTA</del> ATCATGCCGAGGTA	Cebador inverso para reemplazar la arginina 596 por una alanina (R596/A) en LmABCB3

**Tabla 10. Oligonucleótidos empleados para qRT-PCR**

Nombre del Oligonucleótido	Secuencia (5'→3')	Aplicación
FoRTPCR	CTGTACCTCGCCACGTGTGGTG	Cebador directo para obtener ADNc <i>LmABCB3</i>
RvRTPCR	GTGACGTTGCGCAGCTCGATGG	Cebador indirecto para obtener ADNc <i>LmABCB3</i> .
GADPH Fw	GACGGCTCACAAGCACATTG	Cebador directo para obtener ADNc GAPDH
GADPH Rv	AGGGGATGATGTTCTGCGAC	Cebador indirecto para obtener ADNc GAPDH



**Tabla 11. Oligonucleótidos empleados para generar la línea EGFP-ATG8.2 para la determinación de la autofagia en *Trypanosoma brucei*.**

Nombre del Oligonucleótido	Secuencia (5'→3')	Aplicación
EGFP-ATG8.2Fw	<u>AAGCTT</u> ATGAGTAAAAAAGATAGCAAGTAC	Cebador directo para clonar EGFP-ATG8.2 en pLew100
EGFP-ATG8.2Rv	GGATCCTTAGCATCCAAATGTCGCCTC	Cebador inverso para clonar EGFP-ATG8.2 en pLew100.

Aparecen subrayadas las secuencias para las enzimas de restricción.

## II. MÉTODOS

### 1. Alineamiento de secuencias y análisis filogenéticos

Los datos de la secuencia de LmBCB3 (Lm32.3082) se tomaron de la base de datos TriTrypDB (<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>).

El porcentaje de similitud e identidad de LmABCB3 con otras proteínas de interés, se determinó con el programa BLAST ((Basic Local Alignment Search Tool).

Los alineamientos de las secuencias de aminoácidos de las proteínas homólogas se realizaron mediante el programa de alineamiento Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), utilizando el servidor NPS@ (Network Protein Sequence Analysis).

### 2. Cultivo y manipulación de bacterias

Se utilizó la cepa DH5α de *E. coli* como vehículo para la propagación y el aislamiento de plásmidos.

## 2.1 Cultivo *in vitro*

Las bacterias se cultivaron en medio LB líquido a 37°C y agitación constante (180-200 rpm). También se cultivaron en medio sólido, en placas de Petri con LB agar, a 37°C.

Para la selección de transformantes, los medios de cultivo se suplementaron con distintos antibióticos: Ampicilina (100 µg/mL) y Kanamicina (50 µg/mL). En todos los casos los antibióticos se prepararon como soluciones concentradas en agua Milli-Q. Todas las soluciones de antibióticos se esterilizaron por filtración a través de filtros de 0,2 µm (Pall Corporation, Ann Arbor, Michigan EE.UU.) y se adicionaron a los medios previamente autoclavados. La manipulación de los cultivos bacterianos se realizó en condiciones de esterilidad.

## 2.2 Criopreservación y congelación

A partir de colonias aisladas, se cultivaron bacterias en medio LB en agitación constante a 37°C. Los cultivos se tomaron en fase logarítmica de crecimiento y para congelarlos se les adicionó glicerol al 30%. Esta mezcla se distribuyó en crioviales y las células se congelaron a -80°C. Para conservarlas por largos períodos de tiempo, los crioviales se guardaron en contenedores de nitrógeno líquido.

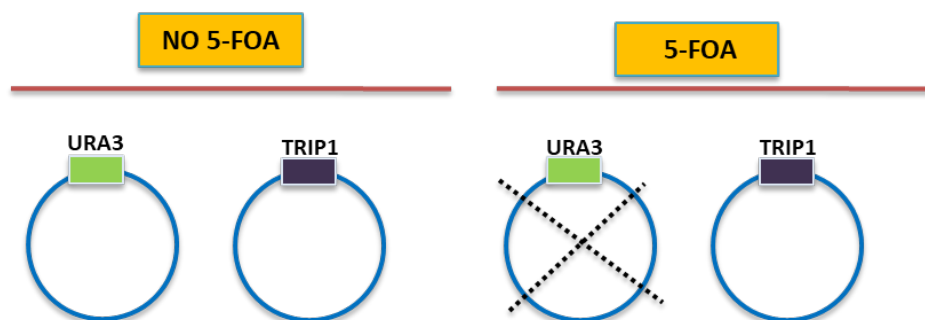
El proceso de descongelación se llevó a cabo arrastrando con una punta de pipeta estéril, parte del contenido del criovial y añadiéndose a 3 mL de medio LB líquido suplementado con el fármaco de selección necesario. Posteriormente, las bacterias se incubaron a 37°C durante 16 h en agitación constante.



## 3. Cultivo y manipulación de levaduras

### 3.1 Cultivo *in vitro*

Las levaduras utilizadas en este trabajo pertenecientes a la especie *S. cerevisiae*, se cultivaron a 28-30°C en medio rico o en medio mínimo, durante 16-18 horas con agitación continua a 220-250 rpm. Para la selección de clones que han perdido el marcador *URA3*, se añadió a las placas con medio mínimo sin triptófano, 1 mg/mL de ácido 5-fluoroorótico (5-FOA).



**Figura 27. Representación esquemática de la selección de clones a través del ácido 5-fluoroorótico (5-FOA).** El 5-FOA es utilizado por levaduras que disponen de la ruta de síntesis de uracilo intacta produciendo un intermedio tóxico que les impide crecer. En este medio únicamente son capaces de crecer aquellas células hayan perdido el plásmido que lleva el gen marcador URA3.

### 3.2 Criopreservación y congelación

Se inocularon 300 µl de un cultivo de levaduras en 50 mL de medio correspondiente (YPD ó SC-Ura/Trip suplementado con glucosa) en un matraz estéril de 500 mL, durante 24 h a 28-30°C. Para recoger las levaduras se centrifugó este cultivo a 3000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente, se descartó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 1 mL de glicerol al 20-25%. Los viales de congelación se guardaron a -80°C o en contenedores de nitrógeno líquido para su mantenimiento durante períodos largos de tiempo.

Para su descongelación, se tomó con una torunda del criovial guardado a -80°C, se sembró en una placa de agar con el medio correspondiente y se incubó a 28-30°C. A los 3-4 días las colonias se hicieron visibles.

### 3.3 Transformación de levaduras

Para transformar *S. cerevisiae*, se usó el método del acetato de litio<sup>235</sup>. Para ello, se preparó un inóculo de 50 µl de células en 5 mL de medio YPD líquido y se incubó 16 h en agitación a 30°C. Al día siguiente, el cultivo se centrifugó en microfuga a máxima velocidad durante 2 minutos, el sedimento se lavó con 1 mL de agua destilada estéril, se volvió a centrifugar en las mismas condiciones y el pellet se resuspendió esta vez en 1 mL de acetato de litio 100 mM. La suspensión resultante se incubó 5 min a 30°C y se volvió a centrifugar.

Tras retirar el sobrenadante, el sedimento se resuspendió en una solución compuesta por PEG3350 (polietilenglicol) al 35% (p/v), 0,1 M AcLi, 2 mg/mL de ADNss de cadena sencilla de esperma de salmón y unos 3 µg del plásmido a transformar en cuestión (tabla 12). El conjunto se agitó con vórtex durante 1 min, incubándose después a 42°C durante 20 min. Finalmente, las levaduras se centrifugaron, el sedimento celular se resuspendió en 300 µl de H<sub>2</sub>O destilada estéril y se sembraron en medio SC sólido suplementado con los aminoácidos adecuados, incubándose a 30°C durante 3 o 4 días, hasta que se visualizaron colonias.

**Tabla 12. Solución de transformación de levaduras**

Componentes	Volumen
PEG3350 35% (p/v)	240 µl
AcLi 0,1 M	36
ADNss Transportador (2 mg/mL)	50
Plásmido a transformar (100 ng)	34
Volumen total (excluyendo las células)	360



## 4. Cultivo y manipulación de *Leishmania*

### 4.1 Cultivo *in vitro*

Las formas promastigotes de *Leishmania major* (MHOM/IL/80/Friedlin) se cultivaron *in vitro* en medio RPMI 1640 modificado suplementado con 10 o 20% de hiFBS, adicionándose además, distintos fármacos en el caso de parásitos transfectados con plásmidos de selección a dichos fármacos.

*L. major* se incubó a 28°C en frascos con tapa sin filtro. Los cultivos se mantuvieron con diluciones periódicas tres veces por semana, midiendo de forma regular su densidad celular en un contador de células Coulter Counter modelo Z1.

Para la obtención de clones independientes de parásitos provenientes de poblaciones heterogéneas, *L. major* se cultivó en medio semisólido en placas de Petri

selladas, las cuales se incubaron a 28°C. Las colonias se hacen visibles entre el 5º y 7º día.

## **4.2 Criopreservación y congelación**

Las células se recogieron en fase exponencial de crecimiento. Para ello, se centrifugaron a 2500 rpm durante 10 min a 4°C y se resuspendieron en una solución de congelación constituida por hiFBS al 90% y dimetilsulfóxido (DMSO) al 10%. Los crioviales se sometieron a una congelación progresiva y se almacenaron a -80°C o en contenedores de nitrógeno líquido para su mantenimiento durante períodos largos de tiempo.

Para su descongelación se diluyó el contenido del vial congelado en medio RPMI 1640 modificado suplementado con 10 o 20% de hiFBS atemperado.

## **4.3 Transfección de *Leishmania***

Promastigotes de *L. major* se recogieron al final de la fase logarítmica, se lavaron dos veces con HBS frío y se resuspendieron a una densidad de 25-30 millones en 400 µl de HBS. A continuación se añadió 10 µg de ADN plasmídico (excepto los controles que llevaron el mismo volumen pero de HBS, unos 30-45 µL). El contenido se pasó a una cubeta de electroporación y esta mezcla se incubó en hielo durante 10 minutos. Pasado este tiempo, se procedió al choque eléctrico en un sistema ECM 600 de BTX, fijando como condiciones 450 voltios y 500 µF. Tras la electroporación, se añadieron 600 µl de medio de cultivo con suero y se volvió a incubar 10 minutos en hielo. Finalmente, el contenido se pasó de la cubeta de electroporación a un frasco de cultivo más 4 mL (5 mL de volumen final) de medio de cultivo con suero. A las 24 h, se realizaron diluciones 1:10, tomando aproximadamente 400 µl del cultivo hasta 3-5 mL de medio nuevo, y se añadió aquí el fármaco de selección. El cultivo se dejó crecer y los parásitos se fueron seleccionando con concentraciones crecientes de fármaco hasta que los controles murieron<sup>70</sup>.



## 5. Cultivo y manipulación de *Trypanosoma brucei*

### 5.1 Formas sanguíneas

#### 5.1.1 Cultivo *in vitro*

Las formas sanguíneas de *T. brucei* se cultivaron en medio HMI-9 suplementado al 10 % con hiFBS, en un incubador humidificado a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub> y en frascos con tapa con filtro. La densidad celular se midió regularmente en un contador de células Coulter Counter modelo Z1, diluyendo 500 µl del cultivo de parásitos en 9,5 mL de medio isotón, y los cultivos se mantuvieron con diluciones periódicas cada dos días, a una densidad celular inferior a 2x10<sup>6</sup> parásitos por mililitro

#### 5.1.2 Criopreservación y congelación

Las células se recogieron en fase exponencial de crecimiento mediante centrifugación (1000xg durante 10 min y a temperatura ambiente) y se resuspendieron en medio de cultivo HMI-9 suplementado con 10% hiFBS con 10% de glicerol. Las células se congelaron lentamente a -80 °C, y para su mantenimiento durante períodos largos de tiempo se trasladaron a contenedores de nitrógeno líquido. Se descongelaron diluyendo el contenido del vial congelado en medio HMI-9 suplementado con el 10% suero bovino fetal inactivado atemperado.



### 5.2 Forma procíclicas

#### 5.2.1 Cultivo *in vitro*

Las formas procíclicas de *T. brucei* se cultivaron en frascos con tapa sin filtro en medio SDM-79 suplementado al 10% con hiFBSy 7,5 µg/mL de hemina, en un incubador a 28°C y concentraciones normales de oxígeno. Los cultivos se mantuvieron con diluciones periódicas cada dos días, midiendo de forma regular su densidad celular en un contador de células Coulter Counter modelo Z1, diluyendo 100 µl del cultivo de parásitos en 9,9 mL de medio isotón.

### **5.2.2 Criopreservación y congelación**

Las células se recogieron durante su fase exponencial de crecimiento mediante centrifugación durante 10 min a 2500 rpm a 4°C y se resuspendieron en medio de cultivo SDM-79 suplementado con 10% hiFBSy 7,5 µg/mL de hemina con 10% de glicerol. Se mantuvieron en congeladores de -80°C y se trasladaron a nitrógeno líquido para su almacenamiento durante largos períodos de tiempo.

Se descongelaron diluyendo el contenido del vial congelado en su medio habitual de cultivo atemperado.

## **6. Cultivo y manipulación de células THP1**

### **6.1 Cultivo *in vitro***

Esta línea celular monocítica humana se mantuvo a 37°C en medio RPMI 1640 suplementado con 10% hiFBS, 2 mM L-Glutamina, 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina, en un incubador humidificado con 5% CO<sub>2</sub> y en frascos con filtro en la tapa.

La diferenciación de monocitos THP1 a macrófagos tuvo lugar gracias a la incorporación de 20 ng de acetato de forbolmiristato (PMA) al cultivo. Tras 48 h de incubación, se produce la adhesión de las células a la placa de cultivo <sup>236</sup>.

### **6.2 Criopreservación y congelación**

Tras un recuento del cultivo celular en cámara de Neubauer, éste se recogió mediante centrifugación durante 10 min a 1500 rpm a 25°C. El sobrenadante se descartó y el sedimento se resuspendió en solución de congelación (90% de hiFBS y 10% de DMSO). Se distribuyeron 2,5 millones de células por criovial y se almacenaron a -80°C o en contenedores de nitrógeno líquido.

Para descongelar las células, se tomó el contenido de un vial y se añadió de manera lenta y progresiva a 10 mL de medio de cultivo RPMi 1640 atemperado (suplementado con 10% hiFBS, 2 mM L-Glutamina, 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina). Al día siguiente, se recogieron las células recién

descongeladas mediante centrifugación y el sedimento se resuspendió en 10 mL de medio nuevo. De esta forma se eliminó totalmente el DMSO que había en el cultivo, asegurándose el crecimiento óptimo de las células.

## **7. Cultivo y manipulación de células MRC-5**

### **7.1 Cultivo *in vitro***

Se mantuvieron 10 mL de células a 37°C en medio DNEM (alto en glucosa) suplementado con 10% hiFBS, 2 mM L-Glutamina, 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina, en un incubador humidificado con 5% CO<sub>2</sub> y en frascos con filtro en la tapa.

Estas células crecen de forma adherente en cultivo, así que para despegarlas se añadió 2-3 mL de tripsina (0.25%) y se volvieron a incubar a 37°C hasta observar que la capa de células estaba dispersa (alrededor de los 5 minutos). A continuación, se añadió medio de cultivo con 10% hiFBS, se resuspendió varias veces pipeteando suavemente, se pasaron 3 mL de este frasco a otro nuevo con 7 mL de medio de cultivo con suero y se volvieron a incubar a 37°C.



### **7.2 Criopreservación y congelación**

Tras la tripsinización (0,25%) de las células, se contabilizaron en cámara de Neubauer y seguidamente el cultivo se recogió mediante centrifugación durante 10 min a 1500 rpm a 25°C. El sobrenadante se descartó y el sedimento se resuspendió en solución de congelación (90% de DNEM completo y 10% de DMSO). Se distribuyeron unos 3 millones de células por criovial y se almacenaron a -80°C o en contenedores de nitrógeno líquido.

Para descongelar las células, se tomó el contenido de un vial y se añadió de manera lenta y progresiva a 10 mL de medio de cultivo DNEM atemperado (suplementado). Al día siguiente, se recogieron las células (previa tripsinización) mediante centrifugación y el sedimento se resuspendió en 10 mL de medio nuevo.

## **8. Clonaje de genes/ORF de *Leishmania* en plásmidos de expresión de *Leishmania* y *Saccharomyces***

### **8.1 Aislamiento de ADN genómico de *L. major***

Se recolectaron mediante centrifugación a 2500 rpm durante 15 min, de 100 a 200 millones de promastigotes en fase logarítmica. Se lavaron dos veces en PBS frío y finalmente se resuspendieron en 1 mL de este mismo buffer. A continuación, las células se lisaron añadiendo NP40 a una concentración final del 1%. La mezcla se agitó mediante inversión suave y se centrifugó en frío (4°C) a 13.000 rpm durante 5 min. Se descartó con cuidado el sobrenadante y el pellet, correspondiente a los núcleos celulares, se resuspendió en 200 µl de PBS frío añadiendo SDS a un 1% de concentración final. Seguidamente, se realizaron dos extracciones con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y una extracción con cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). El ADN genómico se precipitó con 0,1 volumen de acetato sódico (AcONa) 3M (pH: 6,25) y 3 volúmenes de etanol absoluto frío (EtOH). Se agitó mediante inversión suave hasta ver la hebra de ADN o ver tornar a una turbidez de color blanquecino. El ADN se recogió centrifugando en frío (4°C) a 13.000 rpm durante 30 minutos y seguidamente, se procedió a lavar con EtOH al 70% frío, centrifugando a 13.000 rpm durante 5 min a 4°C. El pellet se dejó secar unos 10-15 minutos (hasta eliminar completamente los restos de alcohol) y se resuspendió en 50-80 µl de agua bidestilada estéril. Finalmente, se incubó a 65°C durante 5 minutos y el ADN se cuantificó en un NanoDrop ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer.

### **8.2 Amplificación del ADN**

La amplificación de fragmentos de ADN a partir de ADN genómico o plasmídico, se llevó a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para ello, a lo largo de este trabajo se utilizaron diferentes kits, pero todos ellos con enzimas termoestables de alta fidelidad que presentaban una menor tasa de errores en la amplificación de ADN. Las condiciones de la PCR así como los oligonucleótidos utilizados se ajustaron a cada experimento.

### 8.3 Digestión del ADN con enzimas de restricción

Las enzimas de restricción utilizadas fueron de Roche y de Fermentas y se emplearon de acuerdo a las recomendaciones de cada casa comercial. La purificación de los productos digeridos se realizó con el kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel™) y la cuantificación de los mismos se llevó a cabo un NanoDrop ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer.

### 8.4 Tratamiento con fosfatasa alcalina

Esta enzima hidroliza el grupo fosfato en el extremo 5' del ADN, por lo que cuando se tratan los vectores de clonaje, con esta enzima disminuye la posibilidad de religación de los vectores abiertos. La fosfatasa alcalina utilizada fue de la casa comercial Thermo Fisher Scientificy la reacción se llevó a cabo añadiendo 1 U de enzima e incubando la reacción durante 30 min a 37°C.

### 8.5 Reacción de ligación

Las reacciones de ligación de los fragmentos de ADN en los distintos plásmidos se realizaron con la enzima T4 ADN ligasa, procedente del bacteriófago T4. Para esta reacción se utilizó por lo general relaciones molares inserto: vector de 3:1, salvo en el caso de tratarse con insertos de tamaño parecido al del vector, donde se utilizó una relación de 1:1. Generalmente, la reacción se realizó durante una hora a temperatura ambiente o 16 h a 4°C. El producto de ligación se transformó en bacterias competentes DH5α, en una relación inferior a 1:10 (volumen de ligación: volumen del cultivo de las bacterias).



### 8.6 Selección de los transformantes positivos

Un vez transformadas las bacterias con los plásmidos de interés, se crecieron en placas de LB agar suplementadas con los correspondientes fármacos de selección (100 µg/mL de Ampicilina ó 50 µg/mL de Kanamicina). Las placas se incubaron durante 14-16 h a 37°C y una vez seleccionadas las colonias que pudieran ser positivas, se enviaron a la Unidad de Genómica y Síntesis de ADN de nuestro centro, donde fueron secuenciadas por el método de terminación de la cadena por dideoxinucleótidos o método de Sanger, con un secuenciador automático 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

## **8.7 Aislamiento de ADN plasmídico procedente de cultivos bacterianos**

La extracción tuvo lugar a partir de 3 mL de cultivo con E.Z.N.A.® Plasmid Mini Kit I (Omega Bio-Tek) basado en una lisis alcalina de la pared bacteriana y una desnaturalización selectiva del ADN cromosómico con dodecilsulfato sódico (SDS o NaDS). Para la elución del ADN plasmídico se utilizaron 50-70 µl de agua Milli-Q, que se pasaron dos veces por la columna para mejorar el rendimiento de la elución. La cuantificación y determinación de la pureza del ADN plasmídico se realizó con NanoDrop ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer.

## **8.8 Preparación de células quimio-competentes**

La transformación es el proceso mediante el cual las bacterias captan ADN exógeno, y para ello, las mismas deben tratarse artificialmente para modificar su estructura externa y tornarlas competentes. Este estado de competencia, permite que la célula se vuelva susceptible a la incorporación de ADN.

Se cultivaron 5 mL de la cepa correspondiente en medio LB líquido sin antibiótico, a 37°C, 220 rpm durante 16 h. De este cultivo se realizó una dilución 1/200 en medio LB y se volvió a incubar en las mismas condiciones hasta que la DO<sub>600</sub> fue igual a 0,375. Seguidamente, las células se enfriaron a 4°C durante 15 min y pasado este tiempo, se centrifugaron a 3.000 rpm durante 7 min a 4°C. Una vez eliminado el sobrenadante, el sedimento se resuspendió con MgCl<sub>2</sub> 0,1 M frío en 1/5 del volumen inicial, y esta suspensión se mantuvo a 4°C durante 15-20 min.

Tras la incubación, se volvió a centrifugar de la misma manera y el sedimento se resuspendió esta vez, con CaCl<sub>2</sub> 0,1 M frío en 1/50 del volumen inicial. La mezcla se incubó a 4°C durante 1 hora. Finalmente, se añadió glicerol a la suspensión hasta tener una concentración final del 15%. Se mezcló bien y se hicieron alícuotas de 100 µl, que se mantuvieron a -80°C hasta su uso.

## **8.9 Transformación de *E. coli* por choque térmico**

En la transformación bacteriana se usaron las cepas bacterianas competentes de tipo DH5α y XL-10 Gold®.

DH5α es la cepa de *E. coli* más usada para la transformación y replicación de vectores, válida tanto para la electroporación como para la transformación por

choque térmico. Se partió de una alícuota de 100 µl de células competentes que fueron descongeladas en hielo. Se les adicionó el ADN a transformar, se mezcló suavemente por pipeteo y se incubaron en hielo durante 30 min. Transcurrido este tiempo, se sometieron al choque térmico a 42°C durante 45 segundos y rápidamente se volvieron a pasarlas a hielo durante 2-5 min. Seguidamente, se añadieron 900 µl medio LB líquido atemperado y se incubaron en agitación a 37°C durante 1 hora. Finalmente, las células se sembraron en placas de LB-agar con el antibiótico de selección correspondiente y se incubaron en la estufa a 37°C durante 12-16 h.

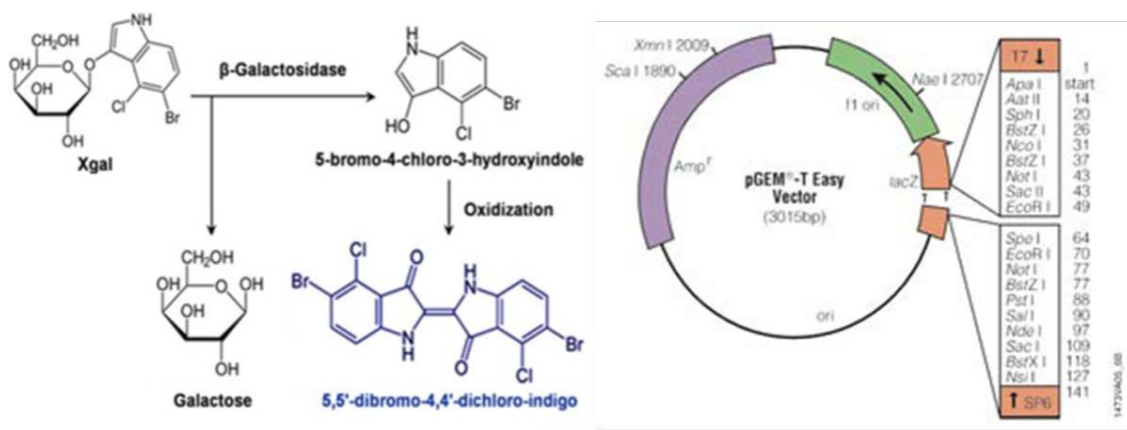
XL-10 Gold® (Agilent, Stratagene), es una cepa de *E. coli* optimizada por presentar una alta eficiencia de transformación, permitiendo transformar vectores de gran tamaño, además de permitir la replicación de ADN humano metilado. Se siguieron las indicaciones de la casa comercial. Para ello, a 45 µl de células (descongeladas previamente en hielo), se añadió 2 µl de β-mercaptoetanol (β-ME) y se incubó durante 10 min en hielo, agitando suavemente cada 2 min. Seguidamente, se añadió el ADN a transformar, se mezcló todo con cuidado y se volvió a pasar a hielo durante 30 min. A continuación, las células se incubaron a 42°C durante 30 segundos y pasado este tiempo, se colocaron rápidamente en hielo durante 2 min. Seguidamente, se añadieron 500 µl de medio LB líquido atemperado y se incubaron a 37°C durante 1 hora en agitación a 220-250 rpm. Finalmente, las células se sembraron en placas de LB-agar con el antibiótico de selección correspondiente y se incubaron en la estufa a 37°C durante más de 16 h



### 8.10 Clonaje de ORF en pGEMT

Este vector posee residuos libres de desoxitimidina en los extremos 3' y se utilizó para el subclonaje de fragmentos de ADN en los plásmidos de interés. La selección de transformantes con el plásmido pGEMT (pGEM®-T Easy Vector Systems, Promega)(figura 28), se basó en dos particularidades. De una parte, el vector contiene el gen de resistencia a la ampicilina, lo que permitió crecer células en placas de LB agar suplementado con este antibiótico. Por otro lado, dicho plásmido contiene también el gen de la β-galactosidasa de *E. coli* como marcador genético de inserción, de manera que al transformar las bacterias *lac*<sup>-</sup> con pGEMT, éstas pasan a ser *lac*<sup>+</sup> y entonces las colonias se colorean de azul si el medio

contiene la sustancia cromogénica X-gal y el inductor IPTG, ya que la enzima  $\beta$ -galactosidasa, hidroliza X-gal a galactosa y 5-bromo-4-cloro-3-hidroxindol, siendo este último oxidado a 5,5'- dibromo-4,4'-dicloro-índigo, un compuesto azul insoluble (figura 28).



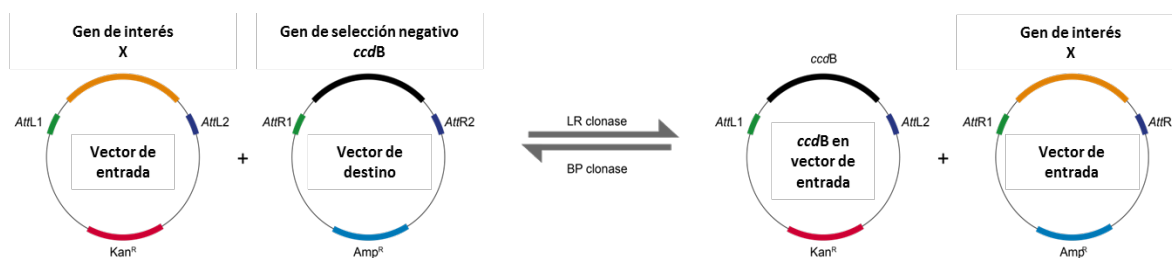
**Figura 28. Hidrólisis de X-gal a galactosa y 5-bromo-4-cloro-3-hidroxindo por la la enzima  $\beta$ -galactosidasa (derecha). Mapa del vector pGEMT (izquierda), tomado de [www.promega.es](http://www.promega.es).**

Sin embargo, si el plásmido contiene el inserto, se interrumpe la pauta de lectura del gen de la enzima, ya que el punto de inserción del fragmento se encuentra dentro de la fase de lectura de la proteína, y las colonias aparecen de color blanco. Finalmente, las colonias blancas obtenidas fueron seleccionadas y crecidas en LB líquido suplementado con ampicilina, con la finalidad de extraer el ADN plasmídico correspondiente y verificar la presencia de inserto en ellas.

### 8.11 Tecnología GATEWAY

Para el clonaje de fragmentos de ADN y construcción de los plásmidos de expresión en levaduras se utilizó la Tecnología Gateway, la cual permite introducir el gen de interés de una manera sencilla en distintos sistemas de análisis funcional, manteniéndose la orientación y el marco de lectura con una alta eficacia y eliminándose la necesidad de secuenciaciones secundarias o de subclonaje después de haber introducido el gen en un vector de entrada. Esta tecnología está basada en las propiedades de integración y escisión del bacteriófago lambda en el genoma de *E. coli* por recombinación. En el sistema Gateway, las reacciones de integración y escisión se llevan a cabo *in vitro*, según se explica en la figura 29.





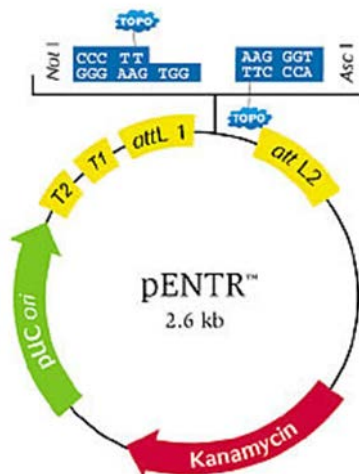
**Figura 29. Clonaje Gateway.** El gen de interés está clonado en un vector de entrada, flanqueado por dos sitios de recombinación attL1 y attL2. El vector de destino contiene todos los elementos necesarios para la expresión del gen de interés, así como dos sitios de recombinación attR1 y attR2 que flanquean el gen de selección negativo ccdB. Tomado de [www.doulix.com/cloning/](http://www.doulix.com/cloning/).

La reacción attL x attR está catalizada por la mezcla de enzimas Gateway® LR Clonase™ II (Invitrogen Cat. No.11791-019). La mezcla contiene, por un lado, las enzimas implicadas en la recombinación del bacteriófago lambda, la Integrasa y la Escisionasa (Xis), y por otro lado, el Factor de Integración en el Hospedador (IHF) de *E. coli*.

### 8.11.1 Clonaje en el vector pENTR/D-TOPO

Para generar los vectores de entrada se utilizó pENTR/D-TOPO (Invitrogen), que permite el clonaje de forma dirigida de productos de PCR entre los sitios de recombinación attL1 y attL2 (figura 30). El vector linearizado tiene asociado de forma covalente una Topoisomerasa I del virus *Vaccinia*, habiéndose añadido la secuencia GTGG a uno de los extremos 5'. Este extremo permite la clonación de forma orientada de los productos de PCR generados, utilizando un cebador forward al que se ha añadido la secuencia CACC. El extremo GTGG del vector linearizado se une a las bases complementarias CACC del producto de PCR, permitiendo la ligación orientada por la Topoisomerasa I.





**Figura 30.** Mapa del vector pENTR™D-TOPO. Tomada de [www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com)

El clonaje se realizó siguiendo las instrucciones de la casa comercial del kit pENTR/SD/D- TOPO® Cloning (Invitrogen). De forma resumida, se tomaron 2  $\mu$ L de producto de PCR y se le añadió 0,5  $\mu$ L de solución salina y 0,5  $\mu$ L del vector TOPO. Esta mezcla se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. En este caso la selección de las bacterias transformantes se realizó en presencia de Kanamicina 50  $\mu$ g/mL.

### 8.11.2 Clonaje en vector de expresión pDR299

Una vez clonado el gen de interés en el vector de entrada, se puede dirigir a diferentes vectores de destino mediante recombinación específica y así llevar a cabo diversos experimentos de análisis funcional y de expresión de proteínas. Para llevar a cabo la reacción de recombinación se siguieron las instrucciones de Gateway® LR Clonase® Enzyme Mix (Invitrogen). La reacción se efectuó incubando durante 1 h a temperatura ambiente y para detenerla se adicionó Proteinasa K. Con el producto de esta reacción se transformaron las células competentes y una vez seleccionadas las colonias, se procedió al aislamiento del ADN plasmídico por el método ya descrito (KIT E.Z.N.A.).

El vector de destino utilizado en los estudios de expresión en *Saccharomyces cerevisiae* fue pDR299ccdB (de expresión constitutiva). Para facilitar el clonaje, este vector presenta dos sitios de recombinación, attR1 y attR2, flanqueando el gen de selección negativa ccdB, que posibilitan una eficiente recombinación con un gen

clonado entre los sitios de recombinación attL en un *attL-flanked Gateway® entry vector* como D-TOPO.

Así mismo, este vector contiene el gen que codifica resistencia a ampicilina, lo que permite la selección de las bacterias transformadas con el gen de interés y también el gen TRP1 que codifica para la triptófano sintetasa, lo que permite la selección auxotrófica en un medio mínimo sin triptófano de las levaduras transformadas.

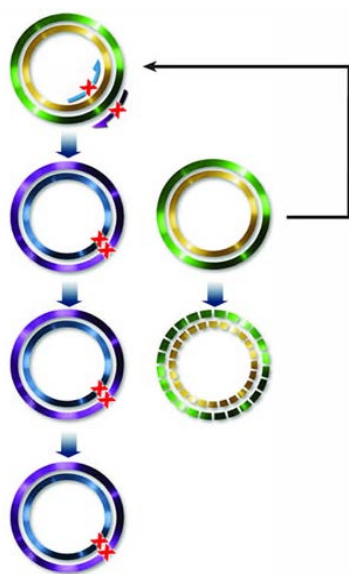
### 8.12 Mutagénesis dirigida

Esta técnica permite generar mutaciones localizadas en un gen de interés reemplazando, delecionando o insertando uno o varios aminoácidos cercanos. Para ello, se empleó el *kit QuikChange II XL Site-Directed* (Agilent Technologies-Stratagene), usando como molde el plásmido de expresión que contenía *LmABCB3* (PXG en el caso de *Leishmana major* y pDR299 en el caso de *S.cerevisiae*).

Se siguieron las indicaciones recogidas en el kit. En primer lugar, se diseñaron los oligonucleótidos usando la web online *QuikChange Primer Design* ([www.agilent.com/genomics/qcpd](http://www.agilent.com/genomics/qcpd)), los cuales incluían la mutación complementaria entre sí. Seguidamente, se realizó una reacción de PCR con la enzima de alta fidelidad *PfuUltra hig-fidelity*, utilizando como molde el ADN parental de doble cadena. El ADN amplificado se digirió con la enzima DpnI endonucleasa que corta exclusivamente el ADN parental metilado o hemimetilado, el cual, posteriormente fue transformado en células ultracompetentes XL 10-Gold.

Para finalizar, se analizó la existencia de la mutación/mutaciones de interés mediante secuenciación en la unidad de genómica y síntesis de ADN del IPBNL.





1.- PCR con los cebadores (representados por las flechas) que contienen la mutación/mutaciones (X) de interés. Los colores verde y amarillo representan el ADN parental.

2.- Digestión con la enzima DpnI, la cual, hidroliza el ADN metilado y hemimetilado.

3.- Transformación del plásmido con el gen de interés mutado (representados por los colores azul y morado) en células ultracompetentes XL 10-Gold.

**Figura 31. Descripción general del proceso de mutagénesis dirigida empleando el *kit QuikChange II XL Site-Directed*.**

## **9. Complementación funcional en levaduras**

### **9.1 Efectos de la expresión heteróloga de LmABCB3 en levaduras *ScΔATM1***

#### **9.1.1 Ensayos de crecimiento de levaduras en medio sólido**

Para realizar los estudios de funcionalidad y complementación, LmABCB3 Wt y mutantes se transformaron en la cepa W303  $\Delta$ ATM1 + ATM1 (MATa,*ade2,can1-100,his3-11,15,leu2-3,112,trp1-1,ura3-,atm1::HIS3::ade4* [pMW114(URA3)]) con el método del acetato de litio, descrito anteriormente.

W303  $\Delta$ ATM1 + ATM1 y W303  $\Delta$ ATM1 + ATM1 + LmABCB3 (Wt y mutantes) se crecieron en placas de medio mínimo SC- Trip sólido en presencia y ausencia de 1 mg/mL de 5-FOA. Se incubaron a 30°C durante tres días.

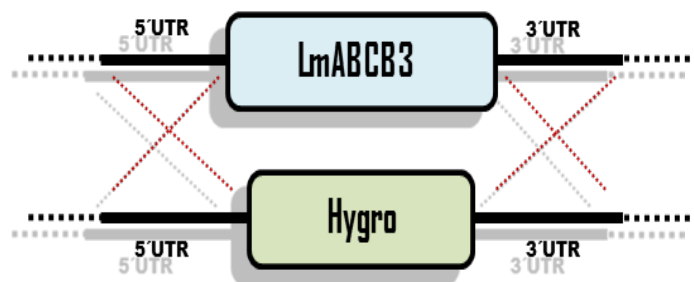
#### **9.1.2 Ensayos de crecimiento de levaduras en medio líquido**

Se realizaron con las líneas W303  $\Delta$ ATM1, W303  $\Delta$ ATM1 + ATM1 y W303  $\Delta$ ATM1 + ABCB3. Para ello, se midió la densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm y los cultivos se diluyeron a 0,05 en medio YPD suplementado con distintas fuentes de carbono fermentables (2% (w/v) glucosa y 3% (w/v) galactosa) y no

fermentables (2% (w/v) lactato, 2% (w/v) glicerol y 2% (v/v) etanol). Se incubó en agitación a 30°C y la  $A_{600}$  se midió a las 24 y 48 h.

## 10. Deleción de un alelo del gen *LmABCB3*

La sustitución dirigida del gen *LmABCB3* se realizó tal y como se describe en <sup>237</sup>. Brevemente, las regiones “aguas arriba” y “aguas abajo” del gen se clonaron en el vector pGEM-T (Promega), usando como molde ADN genómico de *L. major*. Entonces, sobre esa construcción, se utilizó el gen *hyg* (que confiere resistencia a la higromicina B) flanqueado en su extremo 5' por un fragmento de 1,817 kb de la región 5'-no traducida (5'UTR) de *LmABCB3* y en su extremo 3' por un fragmento de 2,773 kb de la región 3'UTR de *LmABCB3* (figura 32).



**Figura 32. Modelo de la doble recombinación que se produce al deleccionar uno de los alelos del gen *LmABCB3* por el cassette de resistencia a la higromicina B en *Leishmania*.**

Los promastigotes de *L. major* en fase logarítmica se transfectaron con 5 µg de ADN linerizado, generado por la digestión con *SphI* y *NotI*, utilizando el sistema Nucleofactor de Amaxa (Lonza). Los parásitos transfectados se seleccionaron con 50 µg/mL de higromicina B, realizando diluciones seriadas de los cultivos y sembrando en placas de 96 pocillos. Se aumentó el volumen de aquellos pocillos en los que se observaron parásitos vivos, y para obtener clones aislados de estas poblaciones se sembraron en placas de medio sólido.

## 11. Análisis de la expresión génica

### 11.1 Aislamiento de ARN total de *Leishmania major*

Se utilizó el kit de aislamiento de ARN total (Roche Biochemicals), en la Unidad de Genómica y Síntesis de DNA del IPBLN, a partir de un cultivo en fase logarítmica de 50 millones de parásitos. La concentración y pureza del ARN obtenido se determinó mediante espectrofotometría, en NanoDrop ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer.

### 11.2 Síntesis y amplificación de ADN complementario

El ADN complementario fue sintetizado a partir de 1 µg de ARN total utilizando el kit de síntesis qSCRIPTTMcdNA (Quanta Biosciences, Inc.) según las recomendaciones del fabricante y siguiendo el protocolo que aparece en la siguiente tabla.

**Tabla 13. Protocolo de síntesis del ADN complementario utilizando como molde ARN.**

Sección	Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	1	22°C	5 min
2	1	42°C	30 min
3	1	85°C	5 min

El ADN complementario fue amplificado con las distintas parejas de oligonucleótidos para cada gen. Los genes de GAPDH se utilizaron como genes normalizadores, al tratarse de genes de expresión constitutiva. La PCR cuantitativa fue llevada a cabo con iTaq Universal SYBR Green Supermix en un termociclador BioRad CFX96. Para confirmar la especificidad se controlaron los valores de T<sub>m</sub> (melting temperature), y para eliminar la posibilidad de contaminaciones con ADN genómico se incluyeron controles en los que no se había añadido la reverso transcriptasa.

### 11.3 Análisis de los resultados

Los resultados mostrados en cada caso de la qRT-PCR son la media de tres experimentos independientes. La cantidad relativa de cada transcrito se calculó utilizando el Software CFX Manager, con el método  $\Delta\Delta C_q^{238}$ . Los datos de los transcritos de los distintos genes se normalizaron con los genes constitutivos actina, tubulina, y GAPDH, siendo calculados como la diferencia en el umbral de los ciclos qPCR ( $\Delta CT = CT \text{ gen de interés} - CT \text{ gen o genes de referencia}$ ). La expresión de cada gen se determinó como la diferencia entre los valores  $\Delta Ct$  ( $\Delta\Delta Ct$ ), utilizando en cada caso su control. Como un ciclo de PCR representa 2 veces la diferencia en la abundancia del ADNc (generado a partir del ARNm por la enzima Reverso Transcriptasa), los cambios en la abundancia relativa se calcularon como  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

## 12. Hibridación ADN-ADN (Southern Blot)

### 12.1 Transferencia alcalina por capilaridad

La transferencia de ADN por capilaridad a una membrana de nylon cargada positivamente se realizó siguiendo el protocolo de transferencia alcalina descrito por<sup>239</sup> con algunas modificaciones. Para ello, el ADN genómico (5  $\mu$ g) previamente digerido se separó por electroforesis en gel de agarosa al 0,8% (p/v) a 60 V durante 150-200 min, en función del tamaño de las bandas que queramos visualizar. La tinción con el bromuro de etidio (BrEt) se realizó tras la electroforesis, sumergiendo el gel durante 15 min en una solución de BrEt 0,25-0,5  $\mu$ g/mL. Una vez fotografiado el gel y establecidas sus dimensiones, éste se sumergió en la solución de despurinización (0,25 M HCl) durante 10-15 min hasta que se produjo el viraje del azul de bromofenol a amarillo. Este tratamiento ácido permite introducir mellas en el ADN y despurinarlo, lo que facilita la transferencia. La desnaturalización alcalina del ADN se realizó sumergiendo el gel en la solución de desnaturalización (NaCl 1,5 M y 0,5 M NaOH) durante 15 min. Pasado este tiempo se renovó la solución y se dejó durante 15 min más.

Posteriormente, el gel se lavó con agua destilada. Para neutralizar el ADN, el gel se sumergió en la solución de neutralización (0,5M Tris-HCl pH 7,5, 1,5 M NaCl) durante 30 min. Pasado ese tiempo, se retiró la solución y se lavó el gel con agua



destilada. Antes de realizar la transferencia, se humedeció una membrana de nylon cargada positivamente (Zeta-Probe Blotting Membranes, BioRad) durante al menos 5 min en la solución SSC 10x (preparado a partir de una solución SSC 20X: 3M NaCl, 0,3 M citrato sódico pH 7). Sobre un cristal se construyó una unidad de transferencia compuesta, de abajo hacia arriba, por: una pieza de papel Whatman cuyos extremos quedaban sumergidos en la solución de transferencia SSC 10x colocada en el reservorio inferior, seguida por el gel colocado en posición invertida (de esta manera tras la transferencia en la membrana quedará las muestras en el mismo orden en que cargamos el gel), la membrana de nylon, tres piezas de papel Whatman y sobre estas, varias capas de papel de filtro que hacen de absorbentes. Se cubrió con otro cristal y por último un peso de 0,5-1 kg comprobando que el sistema estuviese perfectamente horizontal, para dejar la transferencia durante toda la noche. De esta forma, la solución de transferencia ascendió por capilaridad a través del gel arrastrando el ADN hasta la membrana, donde quedó retenido. Finalizada la transferencia, se lavó la membrana con SSC 2X durante 10 min y se secó a temperatura ambiente sobre papel de filtro durante 15-30 min. Por último, el ADN se fijó a la membrana de nylon mediante crosslinking con UV por las dos caras ( $\lambda=254\text{ nm}$  -120 mJ/cm<sup>2</sup>).

Las membranas se conservaron secas entre papel de filtro a temperatura ambiente selladas en bolsa de plástico hasta su utilización.

## **12.2 Marcaje de la sonda con digoxigenina**

Se utilizó un marcaje con digoxigenina acoplada a un dNTP, en este caso dUTP. El marcaje de la sonda con digoxigenina y la detección de los híbridos ADN-ADN se realizó utilizando el sistema comercial DIG DNA Labelling and Detection Kit (Roche). Las sondas de ADN se sintetizaron por PCR utilizando una mezcla de dNTPs que contiene DIG-11-dUTP (Roche), lo que produce una incorporación múltiple de dUTP marcado, ya que puede ser usado como sustrato por la enzima Taq-polimerasa, reemplazando al dTTP durante la reacción en cadena de la polimerasa. Como ADN molde se utilizó 10 ng-3 µg de ADN genómico de cada una de las líneas de *Leishmania major*. Este ADN se desnaturalizó durante 10 min a 98-100°C. Tras la desnaturalización se incubó en hielo (a 4 °C) durante 10 min, y se añadieron 2 µl de hexanucleótidos 10x, 2 µl DIG DNA Labeling Mix 10x y 1 µl de polimerasa Klenow.



Esta mezcla se incubó a 37°C durante 16 h. Esta reacción se detuvo añadiendo 2 µl de EDTA 0,2 M pH 8, 2 µl de LiCl 4 M y 60 µl de etanol absoluto, e incubando 30 min a -80°C. En estas condiciones la sonda precipitó y se resuspendió en 50 µl de tampón TE. La sonda marcada se utilizó diluida a una concentración de entre 5-25 ng/mL en solución de hibridación (DIG Easy Hyb Granules, Roche). Las sondas preparadas en solución de hibridación se conservaron a -20 °C pudiendo ser reutilizadas posteriormente

### 12.3 Hibridación y lavados

El proceso de hibridación utilizando ADN homólogo como sonda se efectuó utilizando un horno de hibridación. La prehibridación de la membrana se realizó durante 2 h a 42°C. Mientras tanto, se desnaturalizó la sonda a 100°C durante 10 min. Tras esta desnaturalización, se incubó la sonda 10 min en hielo, y se diluyó en la solución de hibridación. Una vez concluida la prehibridación de la membrana, se retira esta solución de hibridación y se reemplaza por la solución de hibridación que contiene la sonda marcada y desnaturalizada, dejando incubarse toda la noche a la temperatura de hibridación, con una velocidad de rotación de 30.

El rango de la temperatura de hibridación<sup>240</sup> se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$T_{hib} = T_m \text{ de la sonda} - (20 \text{ o } 25)$$

$$T_m = 49,82 + 0,41 (\% \text{ G+C}) - (600/l)$$

$l$  = longitud de la sonda en número de pares de bases

Tras la hibridación se recuperó la sonda, y se almacenó a -20°C, ya que ésta se puede reutilizar 3-5 veces. En ese caso, es necesario desnaturalizarla a 65°C antes de utilizarla de nuevo. El lavado de la membrana se realizó en las siguientes condiciones de fuerza iónica y temperatura: dos lavados de 5 min cada uno en SSC 2X; SDS 0,1 % (p/v), a temperatura ambiente (horno de hibridación abierto con control de temperatura apagado y velocidad de rotación de 45), seguido de dos lavados de 15 min en SSC 0,1x y SDS 0,1 % (p/v) a 68°C (en el horno de hibridación



y manteniendo la velocidad de rotación en 45). Los lavados permiten retirar la sonda hibridada inespecíficamente.

#### **12.4 Detección inmunológica**

La detección con fosfatasa alcalina se realizó a temperatura ambiente. Esta reacción se realizó con el sistema Detection Kit (Roche), siguiendo el protocolo detallado por el fabricante con leves modificaciones. La detección de la sonda se basa en el uso de anticuerpos antidigoxigenina conjugados con la enzima fosfatasa alcalina. Esta enzima provoca la desfosforilación del sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato (BCIP) para dar lugar a un producto de color azul oscuro. La sal de azul de nitrotetrazolio (NBT) actúa como oxidante y también genera un color azul oscuro, de modo que se intensifica el color al producirse un precipitado azul insoluble, lo que hizo que la detección sea más sensible.

La membrana se lavó durante 3 min con tampón de lavado (solución de ácido maléico con 0,3% Tween 20). Tras este lavado, la membrana se incubó primero durante 30 min en solución de bloqueo (Blocking Reagent de Roche, en solución de ácido maléico), para evitar la unión específica de los anticuerpos anti-digoxigenina a la membrana, y posteriormente otros 30 min con solución de anticuerpo (solución de bloqueo con antidigoxigenin-AP conjugate Fab fragments de Roche, en una dilución 1:10000). Tras la incubación con el anticuerpo, se lavó la membrana dos veces durante 15 min con tampón de lavado, y después se equilibró durante 5 min con la solución de detección (0,1 M Tris-HCl y 0,1 M NaCl, pH 9,5).

Para la visualización de las bandas, la membrana se incubó con la solución de detección suplementada con NBT/BCIP (Roche) en oscuridad hasta que aparecieron las bandas. Esta última reacción se paró lavando la membrana con agua destilada.

### 13. Microscopía de fluorescencia

Se realizaron estudios de co-localización empleando promastigotes que expresaban LmABCB3 fusionada a la proteína verde fluorescente (GFP) en el extremo carboxilo terminal. Para el marcaje de la mitocondria, promastigotes en fase exponencial de crecimiento, se incubaron con 50 nM Mitotracker red (Molecular Probes) durante 30 min a 28°C en medio RPMI 1640 modificado sin hiFBS<sup>158</sup>. Tras la incubación, los parásitos se lavaron dos veces con PBS frío. Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio confocal Leica SP5 y deconvolucionadas usando el software de procesamiento de imágenes Huygens Professional de Scientific Volume Imaging (<http://www.svi.nl>).

La interacción entre AS-48 y las formas sanguíneas de *T. brucei*, en un primer lugar se analizó a través de estudios de microscopia de fluorescencia utilizando para ello AS-48 fluoresceinada. De este modo, se recolectaron  $2 \times 10^6$  células de *T. b. brucei*, se lavaron con TDB y se resuspendieron en 1 mL del mismo tampón. Seguidamente se incubaron a 37°C durante 10 minutos y pasado este tiempo se añadió 1  $\mu$ M de FITC-AS-48 e inmediatamente las células se fijaron durante una hora a 4°C en PFA 2%. Los parásitos finalmente se lavaron dos veces en PBS y fueron analizados en un microscopio Olympus (Cell R IX81).



### 14. Detección de proteínas (Western Blot)

#### 14.1 Transferencia a la membrana

Las proteínas recombinantes fusionadas a GFP se detectaron utilizando un anticuerpo policlonal anti- GFP de conejo (Molecular Probes, Invitrogen). Para ello, las proteínas se transfirieron a un soporte sólido a partir de un gel SDS-PAGE y posteriormente se inmunodetectaron por quimioluminiscencia.

El soporte sólido utilizado fueron membranas de difluoropolivinilideno (PVDF) que presentan un tamaño de poro de 0,45  $\mu$ m y son capaces de retener proteínas de más de 10 Kda. Las incubaciones del gel así como las de la membrana en las distintas soluciones empleadas se realizaron a temperatura ambiente y en agitación.

Como primer paso de esta técnica, el gel desnaturalizante de SDS, que contenía las proteínas a analizar fue incubado durante 30 min en solución de transferencia. Mientras tanto, la membrana de PVDF, de un tamaño ligeramente superior que el gel, fue sumergida en metanol absoluto durante 15 seg y posteriormente lavada durante 2 min con agua Milli-Q®. A continuación, la membrana fue incubada durante 5 min en la solución de transferencia. Posteriormente, sobre la placa correspondiente al polo positivo del dispositivo de transferencia, se depositó una pieza de papel “Extra Thick Blot Paper” del mismo tamaño que la membrana, previamente humedecida en la solución de transferencia. Sobre ellas se depositó la membrana de PVDF y, a continuación, se colocó el gel de SDS-PAGE, y sobre éste otra pieza de papel “Extra Thick Blot Paper” del mismo tamaño que la membrana, también humedecida en la solución de transferencia. Finalmente, se colocó la placa correspondiente al polo negativo del dispositivo de transferencia. La transferencia se realizó durante 45 min a 23 V.

A continuación, para comprobar la eficiencia de la transferencia, la membrana se incubó durante 5 min en la solución de transferencia y, seguidamente, se tiñó con la solución de Rojo Ponceau (5%) y ácido acético (1%) durante 1 min. Posteriormente, la membrana se lavó con agua Milli-Q® hasta visualizar las proteínas. Con un lápiz se pueden anotar sobre la membrana las posiciones de los pesos moleculares estándares. Inmediatamente, se destiñó la membrana utilizando una solución de 0,1 N NaOH. Posteriormente, la membrana se bloqueó con la solución de bloqueo durante 2 h a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4°C.

## **14.2 Detección inmunológica**

Para detectar las proteínas fijadas a la membrana de PVDF, ésta se incubó durante 1 h en solución de inmunodetección con el anticuerpo Anti-GFP (anticuerpo primario). A continuación, la membrana se lavó 3 veces durante 10 min en tampón de lavado y se incubó durante 1 h en solución de inmunodetección con el anticuerpo secundario correspondiente en cada caso. Tras esta última incubación, la membrana se lavó de nuevo 3 veces durante 10 min. La detección de la proteína se realizó por quimioluminiscencia utilizando el kit comercial ECL (Pierce® ECL Western Blotting Substrate, Thermo Scientific).

## 15. Infección in vitro de macrófagos THP1

Los macrófagos THP-1 se infectaron a 35°C con formas promastigotes de *L. major* WT (control) y *LmABCB3<sup>+/-</sup>* en fase estacionaria en un ratio 1:10 (macrófago: parásito). A las 24h, las células se lavaron para eliminar aquellos promastigotes que no habían penetrado en las células y seguidamente, se incubaron durante 24 y 120 h a 37°C y en una atmósfera con 5% CO<sub>2</sub>. Finalmente, las células se fijaron con PFA 2%, se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,1% y se tiñeron con DAPI. Los núcleos teñidos tanto de las células como de los amastigotes intracelulares se observaron por microscopía de fluorescencia en campo amplio Olympus IX81. Los parásitos se cuantificaron utilizando el software Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

## 16. Modelo murino de leishmaniasis cutánea

Las infecciones *in vivo* se llevaron a cabo en ratones macho C57BL/6 J de seis semanas de edad (proporcionados por Charles River Breeding Laboratories). Los animales se mantuvieron en la Unidad de Experimentación Animal del IPBNL en condiciones libres de patógenos y se organizaron en grupos de siete ratones por caja. Las infecciones se realizaron en la almohadilla plantar de las patas izquierdas traseras, inoculando por vía subcutánea, un millón de promastigotes estacionarios de *Leishmania major* resuspendidos en PBS. La progresión de la enfermedad se

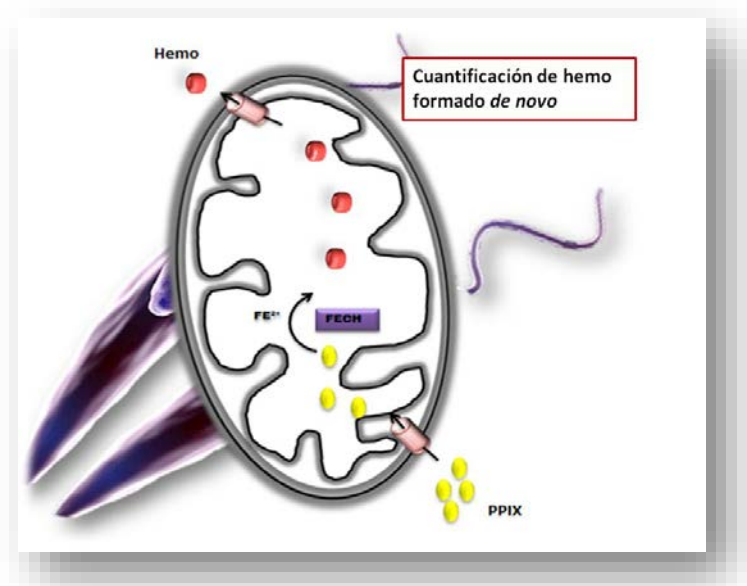
determinó por la inflamación y el área de la lesión de la almohadilla plantar de la pata infectada usando un calibre Digimatic (Mitutoyo, Japan), y comparando estos valores con los de la pata no infectada.



**Figura 33. Medida de la inflamación y el área de la lesión de la almohadilla de la pata infectada usando un calibre Digimatic**

## 17. Formación de hemo *de novo* a partir de PPIX

La síntesis de hemo a partir de su precursor PPIX se cuantificó tomando como referencia<sup>158</sup> e incluyendo algunas modificaciones. Para ello, parásitos en fase logarítmica de crecimiento se incubaron durante 16 h a 28°C en medio de cultivo RPMI suplementado con 10% de hiFBS depletado de hemo en ausencia o presencia de 0,5  $\mu\text{M}$  de PPIX. Tras la incubación, los parásitos se lavaron y seguidamente fueron lisados con ciclos de congelación/descongelación en nitrógeno líquido. El hemo intracelular se midió con el kit Hemin Assay (Sigma-Aldrich) y para poder hacer estudios comparativos entre diferentes muestras, la cantidad de proteína fue normalizada en cada uno de los ensayos.



**Figura 34. La enzima ferroquelatasa cataliza la incorporación de un átomo de hierro ferroso a la molécula de PPIX, formando la molécula de hemo.** Esta enzima está presente en *Leishmania* spp., de tal forma que la molécula esencial de hemo puede ser sustituida por PPIX. En este ensayo se va a medir la cantidad de hemo formado a partir de PPIX que se añade en el medio, gracias a la actividad de la enzima ferroquelatasa que posee el parásito.

La diferencia entre los niveles de hemo en parásitos incubados en presencia o ausencia de PPIX, fue el hemo sintetizado *de novo* y esto fue medible debido a que a diferencia de los otros géneros de tripanosomátidos patógenos (*Trypanosoma brucei* y *Trypanosoma cruzi*), *Leishmania* spp. posee el gen de la ferroquelatasa, el cual, es capaz de catalizar la incorporación de un átomo de hierro al precursor PPIX y de este modo sintetizar hemo.

## 18. Ensayos de precipitación con hemina-agarosa

Los ensayos de precipitación con hemina-agarosa se llevaron a cabo como se describe en<sup>158</sup>, pero solubilizando las proteínas de membrana antes del ensayo de precipitación. Para ello, se obtuvieron 2 mg de proteínas de membrana de parásitos que expresaban LmABCB3-GFPm como se describe en<sup>241</sup> con Tritón X-100 al 1% durante 3 h a 4°C. Después de la ultracentrifugación, las proteínas solubilizadas se diluyeron 10 veces con tampón de dilución (100 mM KPi pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM DTT and 1 mM PMSF) para disminuir la concentración final de detergente a un 0,1%. Las alícuotas de hemina agarosa se equilibraron con tampón de dilución frío que contenía Tritón X-100 al 0,1% e incubadas con 30 µg de proteína solubilizada durante 30 min a 4°C. Luego, se lavaron cuatro veces con tampón de lavado frío y se eluyeron con 20 µl de tampón Laemmli. La proteína de fusión LmABCB3-GFP se detectó por Western Blot utilizando un anticuerpo policlonal anti GFP. Finalmente, se añadieron diferentes concentraciones de hemina durante la incubación de las proteínas solubilizadas con la hemina agarosa.

## 19. Modelado computacional

### 19.1 Análisis de acoplamiento molecular (docking)

El análisis de acoplamiento molecular o docking, es un método que predice la conformación preferida de una molécula al estar unida a otra, con el fin de formar un complejo estable. Para la estructura en 3D de LmABCB3 (aa 283–875) se construyó un modelo usando el servidor de modelado molecular Phyre2 basado en la secuencia proteica completa de Lmajor ABCB3 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>).

El servidor DALI, ([http://ekhidna.biocenter.helsinki.fi/dali\\_server/](http://ekhidna.biocenter.helsinki.fi/dali_server/)) calculó la superposición estructural en 3D de la estructura de ScATM1 (pdb code: 1 MHY, aa) y el modelo de *L. major* ABCB3.



## 19.2 Herramientas bioinformáticas usadas

Las secuencias proteicas se obtuvieron usando la base de datos Uniprot (<http://www.uniprot.org/>). Esto permitió una búsqueda de patrones de homología a través de los programas BLAST ([http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)) y CLUSTALW ([https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsa\\_clustalw.html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_clustalw.html)).

La identificación de nuevas regiones no descritas y potenciales en la secuencia UNE de LmABCB3 se logró mediante el recurso de reconocimiento de dominio SMART. El software de reconocimiento de topología de membrana MEMSAT3 (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/?id=756>) se utilizó a través de la plataforma interactiva para el análisis de predicción de estructura secundaria PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>). La identificación de una secuencia diana mitocondrial se realizó utilizando el software Mitoprot (<http://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html>).

Para evaluar el análisis filogenético de secuencias mitocondriales de transportadores ABCB, las secuencias proteicas fueron primero alineadas usando el servidor MAFFT (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>).

## 20. Ensayos de citotoxicidad de los distintos compuestos

### 20.1 *Leishmania*

El ensayo de citotoxicidad en *Leishmania* se basa en el método del MTT. Este método está basado en la capacidad de las deshidrogenasas de convertir el sustrato bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5-difeniltetrazolio (MTT), soluble y amarillo, en el producto formazán, insoluble y de color púrpura. La cantidad de producto formado depende del número de células y de la viabilidad de las mismas, y se cuantifica espectrofotométricamente tras solubilizar los cristales de formazán con SDS.



Para realizar el ensayo, se sembraron 200.000 parásitos/pocillo en un volumen final de 100 µl de RPMi suplementado al 10% de hiFBS, en placa de 96 pocillos, y se incubó durante 72 h a 28°C en presencia de distintas concentraciones de fármaco, por duplicado. A continuación, se añadieron 10 µl de MTT (preparado a 5 mg/mL en PBS) y se incubó durante 4 h en oscuridad a 28°C para permitir la formación de los cristales. Finalmente, los cristales de formazán se disolvieron añadiendo 50 µl de SDS al 20% e incubando en oscuridad a 37 °C durante 4-16 h. La reducción de MTT se determinó leyendo la DO540 en un lector de ELISA.

## 20.2 *Trypanosoma brucei*

La resazurina o alamar blue es un indicador redox que permite detectar la viabilidad de las células. Este método se basa en la capacidad de las deshidrogenasas de reducir la resazurina (7-Hydroxy-3H-phenoxazin-3-one 10-oxide), que es una sonda azul muy poco fluorescente a resorufina, que es de color rosa y fluorescente. La cantidad de resorufina formada es directamente proporcional al número de células y a su viabilidad. Mediante esta técnica, por lo tanto, podemos determinar la resistencia o susceptibilidad celular a determinados compuestos o fármacos.

Para realizar el ensayo, se sembraron en una placa de microtitulación de 96 pocillos una cantidad conocida de células (10<sup>4</sup> parásitos/pocillo para las formas sanguíneas de *Trypanosoma brucei* (*T. b. rhodesiense*, *T. b. gambiense* y *T.b. brucei*) y 10<sup>6</sup> parásitos/pocillo para las formas procíclicas de *Trypanosoma brucei* en un volumen final de 100 µl de medio de cultivo en presencia de concentraciones crecientes de los distintos compuestos a ensayar. Tras una incubación de 72 h a 37°C, se añadieron 20 µl de la solución de resazurina (preparado a 0,11 mg/mL) y se volvió a incubar la placa, esta vez en oscuridad, durante 4 h a 37°C para permitir el viraje del color debido a la formación de resorufina. Finalmente, se añaden 50 µl de SDS al 3% y se mide la absorbancia a una longitud de onda de 550 nm de excitación y 590 nm de emisión.



### 20.3 Células MRC-5

Las células MRC-5 se recogieron mediante tripsinización (0,25%) y se sembraron en placas de 96 pocillos (5000 células en 100  $\mu$ L/pocillo) en presencia de concentraciones crecientes de los distintos compuestos a ensayar. Tras una incubación de 72 h a 37 °C, se añadieron 20  $\mu$ L de la solución de resazurina y se volvió a incubar la placa en oscuridad durante 4 h a 37°C. Tras la adición de SDS al 3% se midió la absorbancia a 550 nm exc/ 590 nm de em.

### 21. Obtención y marcaje de AS-48

AS-48 fue amablemente facilitado por el grupo BIO160 de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada. De igual modo, el marcaje de AS-48 con isotiocianato de fluoresceína (FITC-AS-48)<sup>229</sup>, se realizó en el grupo BIO160 y fue proporcionado para la realización de los estudios funcionales que se desarrollaran a continuación.

### 22. Purificación de VSG

La purificación de la VSG121 procedente de las formas sanguíneas de *T. b. brucei* se realizó como se describe en<sup>105,105</sup>. Para ello, se partió de un cultivo de 200-300 mL de parásitos en fase logarítmica de crecimiento, el cual se centrifugó a 1.800 rpm durante 10 min a 4°C. Tras eliminar cuidadosamente el sobrenadante, los parásitos se resuspendieron en TDB frío a una concentración de 500 mill/mL. Seguidamente, se volvió a centrifugar esta vez a 4.000 rpm durante 1 min a temperatura ambiente y se procedió a la lisis por choque osmótico: Tras eliminar el sobrenadante, el pellet se resuspendió (en la misma cantidad que añadimos de TDB) en agua bidestilada a 0°C, se incubó en hielo durante 15 minutos y transcurrido este tiempo, se centrifugó nuevamente a 4.000 rpm durante 1 min a temperatura ambiente. Finalmente se procedió a la liberación de la VSG: Tras retirar el sobrenadante después de la centrifugación, el pellet se resuspendió en acetato de zinc 0,5 mM en la misma cantidad en la que lo hicimos al principio con TDB y agua bidestilada. Se incubó a 37°C durante 5 min, se centrifugó a 5.200 rpm a 4°C y el sobrenadante donde se encuentra la VSG purificada, se pasa a un LoBind eppendorf tube.

## 23. Análisis del mecanismos de entrada de AS-48

### 23.1 Citotoxicidad en función de la temperatura

2x10<sup>6</sup> de *T. brucei* BSF cultivadas en fase logarítmica de crecimiento se trataron con 100 y 500 nM de AS-48 y se incubaron durante 30 y 60 min a 4 y 37°C. Como control se utilizaron parásitos sin tratar. Tras la incubación se observaron en un microscopio de campo amplio para determinar las diferencias en morfología y movilidad producidas por el péptido.

### 23.2 Determinación de la permeabilización de la membrana plasmática

El efecto de AS-48 en la membrana de los parásitos se evaluó por citometría de flujo usando la sonda vital SYTOX Green. La membrana plasmática de *Trypanosoma* es impermeable a la sonda fluorescente SYTOX Green, pero cuando se produce una alteración estructural suficiente de la misma, la sonda penetra en el interior celular y se une a los ácidos nucleicos con gran afinidad tiñéndolos e incrementando su fluorescencia. El experimento se llevó a cabo como se describe en<sup>242</sup>. Las formas sanguíneas de *T. b. brucei* se cultivaron en fase logarítmica en medio HMI-9 suplementado con 10% de SBI y 1x10<sup>7</sup> parásitos/mL fueron recolectados e incubados a 4 y 37°C con 0.05, 0.1 o 0.5 µM de AS-48 durante 10, 30 y 60 minutos. Seguidamente, se añadió 5 nM de SYTOX® y los parásitos se incubaron a 4°C durante 10 minutos. Finalmente, los parásitos se lavaron dos veces con PBS, se resuspendieron en 300 µL de este mismo tampón y se analizaron en un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson, CA, EE. UU.). Como control de la permeabilización se utilizó Triton™ X-100 (0.1%) (Sigma).



### 23.3 Determinación de la entrada de AS-48 mediante citometría de flujo

Las formas sanguíneas de *T. b. brucei* se cultivaron en fase logarítmica en medio HMI-9 suplementado con 10% de hiFBS y 1x10<sup>7</sup> parásitos/mL fueron recolectados e incubados a 4 y 37 °C con 0.2 µM de FITC-AS-48 durante 10, 30, 45 y 60 min. Tras la incubación, los parásitos se lavaron dos veces con PBS, se resuspendieron en 300 µL de este mismo tampón y se analizaron en un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson, CA, EE. UU.). Como control se utilizó AS-48 sin marcar.

### **23.4 Inhibición de la endocitosis mediada por clatrina**

Para determinar el papel de la endocitosis en la acción tripanocida de AS-48, se inhibió específicamente la endocitosis reduciendo la expresión de la clatrina (TbCLH) a través de la interferencia del ARN (ARNi).

Las células transfectadas con p2T7TiCLH se seleccionaron con 2,5 µg/mL de G418 y 5 µg/mL de higromicina. Los clones se indujeron con 5 µg/mL de doxiciclina y se seleccionaron por defecto de crecimiento y disminución de la entrada de transferrina humana (HT)<sup>243</sup>. Esta línea celular fue creada y cedida amablemente por el laboratorio del Dr. Miguel Navarro del IPBNL-CSIC para la realización de los experimentos que a continuación se detallan.

Después de confirmar que la entrada de transferrina humana por endocitosis disminuyó al 59% tras 4 horas de inducción de ARNi y sin afectar el crecimiento celular (datos no mostrados), se realizó el ensayo funcional con AS-48. Para ello, las células knockeadas TbCLH (KD) se incubaron con 50 y 100 nM de la bacteriocina y luego se evaluó la supervivencia celular después de 10, 30 y 60 min. El efecto de AS-48 sobre el crecimiento celular de las formas sanguíneas de *T. b. brucei* se realizó por triplicado con células inducidas durante 4 h.

## **24. Análisis de la interacción AS-48-VSG**

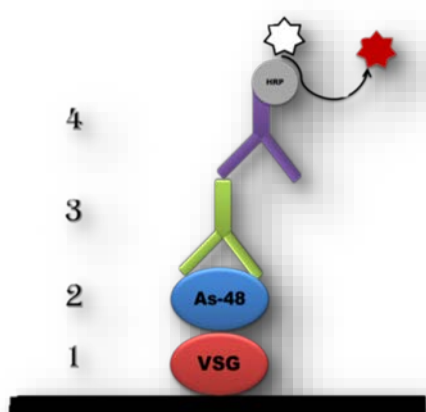
### **24.1 Microscopía de fluorescencia**

La interacción entre AS-48 y las formas sanguíneas de *T. brucei*, en un primer lugar se analizó a través de estudios de microscopía de fluorescencia utilizando para ello AS-48 fluoresceinada. De este modo, se recolectaron  $2 \times 10^6$  células de *T. b. brucei*, se lavaron con TDB y se resuspendieron en 1 mL del mismo tampón. Seguidamente se incubaron a 37°C durante 10 minutos y pasado este tiempo se añadió 1 µM de FITC-AS-48 e inmediatamente las células se fijaron durante una hora a 4°C en PFA 2%. Los parásitos finalmente se lavaron dos veces en PBS y fueron analizados en un microscopio Olympus (Cell R IX81).

## 24.2 Ensayo tipo ELISA

La capacidad de AS-48 para interactuar con VSG purificado se evaluó mediante la técnica de inmunoensayo ELISA, tal y como se describe en<sup>244</sup> pero con algunas modificaciones que se detallan a continuación.

En primer lugar, la placa de 96 pocillos fue tapizada con 100  $\mu$ L/pocillo de VSG121 purificada (a una concentración de 10  $\mu$ g/mL en tampón fosfato 0.1 M, pH 9.0) y se incubó durante la noche a 4°C para permitir, de esta manera, la fijación al soporte o tapizado. Al día siguiente, la placa se lavó cuatro veces con 200  $\mu$ L de tampón de lavado (PBS 1X con 0.01% de Tween-20) y seguidamente se bloqueó con hiFBS durante dos horas a temperatura ambiente. A continuación la placa se volvió a lavar cuatro veces con tampón de lavado y se añadió AS-48 (a una concentración de 10  $\mu$ g/mL en PBS 1X, pH 7.4) dejando la incubación esta vez a 37°C durante 4 h (a los controles sólo se les añadió PBS 1X). Pasadas las 4 h, se volvió a lavar cuatro veces y se añadió 100  $\mu$ L/pocillo (dilución 1/100) del anticuerpo policlonal anti-AS-48<sup>233</sup> y se incubó a 37 °C durante 2 h. Finalmente y tras lavar cuatro veces de nuevo, se adicionó 100  $\mu$ L/pocillo de peroxidasa de rábano picante (HRP) conjugada con anticuerpo IgG anti-conejo (Abcam) y se incubó a 37°C durante 2 h. Después de otros ocho lavados, se desarrolló el color usando ABTS (sal de diamonio de 2,2'-azino-di-[3-etil-benzotiazolin-6-sulfónico]) como sustrato de HRP. La absorbancia se midió a 450 nm.



**Figura 35. Ensayo tipo ELISA.** 1) Fijación al soporte ("tapizado") de la VSG121. Lavado para eliminar los antígenos fijados deficientemente o no fijados y bloqueo con SFBi. 2) Adicción de AS-48, incubación y lavado para eliminar de nuevo los antígenos fijados deficientemente o no fijados. 3) Adición del anticuerpo policlonal frente a AS-48, incubación y lavado. 4) Adición del anticuerpo secundario marcado con la enzima HRP, posterior adicción del sustrato, desarrollo del color y medición de la absorbancia

## 25. Determinación de la autofagia

### 25.1 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

Los parásitos ( $2 \times 10^6$  mL de tripanosomas sanguíneos) se incubaron con 0,1  $\mu$ M AS-48 a 37°C durante 30 minutos y posteriormente fueron fijados y tratados como se describe en<sup>229</sup>. Posteriormente, se cortaron secciones ultrafinas de 500 Å en el microtomo Ultra Leica S Leica, se contratiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo y se tomaron imágenes de las muestras en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss 902.

### 25.2 Monitorización de autofagosomas ATG8.2

Las formas sanguíneas de *T. b .brucei*, se transfectaron con EGFP-ATG8.2-pLew100, como se describe en<sup>109</sup>. Una vez seleccionados los clones y establecido el cultivo, los parásitos EGF-ATG8.2 se crecieron en fase logarítmica, se concentraron a  $10^7$  células/mL, se trataron con 100 nM de AS-48 y se incubaron a 37°C durante 30 y 60 minutos. Tras la incubación, los parásitos se lavaron dos veces en PBS y se fijaron durante una hora a 4°C en PFA 2%. La autofagia se visualizó mediante microscopía de fluorescencia contando el número de autofagosomas marcados con EGFP-ATG8.2 por célula (se contaron más de 200 células por condición).

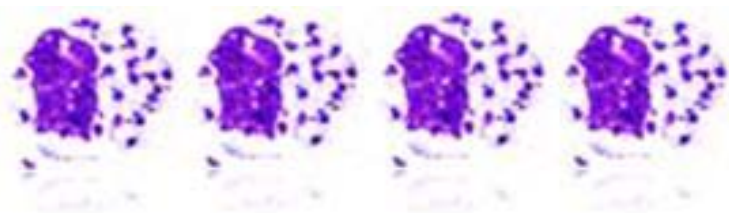
## 26. Análisis estadísticos

Los experimentos se realizaron al menos tres veces por duplicado. Todos los datos se presentan como media y desviación estándar (SD.) se determinó el valor de las diferencias estadísticas mediante el *t*-test de Student y se consideraron significativas para un  $p < 0,05$ .

## 27. Compuestos con actividad tripanocida

- **Tafenoquina y sitamaquina:** Cedidas por GlaxoSmithKlin.
- **Derivados de tirosol e hidroxitirosol:** Cedidos por los Dres. Juan Carlos Morales (IPBLN-CSIC) y Andrés Parra (UGR).
- **Derivados de resveratrol, quercetina, curcumina y ácido gálico:** Cedidos por el Dr. Juan Carlos Morales (IPBLN-CSIC).
- **Ligandos de G-quadruplex (G4):** Cedidos por los Dres. Juan Carlos Morales (IPBLN-CSIC) y Mauro Freccero (Universidad de Pavia).







# BLOQUE I

---

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

### CARACTERIZACIÓN DE UNA DIANA FARMACOLÓGICA EN *LEISHMANIA*

---

Los resultados del siguiente capítulo forman parte del artículo:

**“LmABCB3, an atypical mitochondrial ABC transporter essential for *Leishmania major* virulence, acts in heme and cytosolic iron/sulfur clusters biogenesis”.**

Publicados en Parasit.Vectors. 2016 Jan 5;9:



# **LmABCB3 es un transportador mitocondrial esencial para la virulencia de *Leishmania major* que actúa en la biogénesis de los clústeres citosólicos Fe/S y del grupo hemo**

## **Resumen**

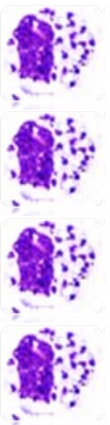
---

La leishmaniasis abarca un conjunto de enfermedades, con una amplia diversidad clínica y epidemiológica, causada por diferentes especies de parásitos protozoarios intracelulares del género *Leishmania*. En ausencia de vacunas, la quimioterapia sigue siendo el arma principal para combatir esta enfermedad. Sin embargo, la eficacia limitada y la alta toxicidad de los fármacos disponibles, junto con la aparición de numerosas cepas resistentes a los medicamentos, han comprometido seriamente su utilidad. Por lo tanto, existe una necesidad urgente de encontrar nuevos tratamientos para esta enfermedad olvidada.

*Leishmania* es auxótrofo para el grupo hemo y debe adquirir esta porfirina esencial del huésped. Las proteínas implicadas en la captación y el tráfico intracelular de porfirinas podrían representar dianas atractivas para el desarrollo de nuevos fármacos. Independientemente del mecanismo de importación, el hemo debe llegar a la mitocondria, donde se requiere para la síntesis de los citocromos de la cadena respiratoria.

En mamíferos, se ha propuesto que dos ABCs mitocondriales de tipo half-transporters, ABCB6 y ABCB7, están involucrados en el transporte de porfirinas y en el ensamblaje de ISC, respectivamente.

El primer objetivo general de este trabajo consistió en la caracterización funcional en *L. major* de LmABCB3, una proteína que muestra una similitud de secuencia significativa con ABCB6 y ABCB7 humanos.



## Resultados

### 1. LmABCB3 es un transportador ABC atípico al presentar una Extensión N-terminal Única (UNE)

Aunque el tráfico mitocondrial de porfirinas aún no se ha caracterizado en *Leishmania* o *Trypanosoma*, en los últimos años se han informado de importantes hallazgos en otros organismos, especialmente en levaduras, ratones y humanos. Algunos de estos transportadores de porfirinas, pertenecen a una de las familias más abundantes de proteínas integrales de membrana que se encuentran en los tres reinos de la vida, nos referimos a los transportadores ABC.

Al inicio de esta tesis doctoral, ABCB6 era el único transportador descrito como importador de porfirinas hacia la mitocondria<sup>245</sup>. Por este motivo, usamos ABCB6 humano, como molde para identificar supuestos homólogos en la base de datos del genoma de *L. major*. Este análisis preliminar, identificó un candidato potencial denominado **ABCB3** (LmjF.32.3080) por Leprohon y colaboradores<sup>186</sup>. Según estaba anotado en el genoma, el gen contenía 2.112 nucleótidos y codificaba para una proteína de 704 aminoácidos (77.39 kDa).

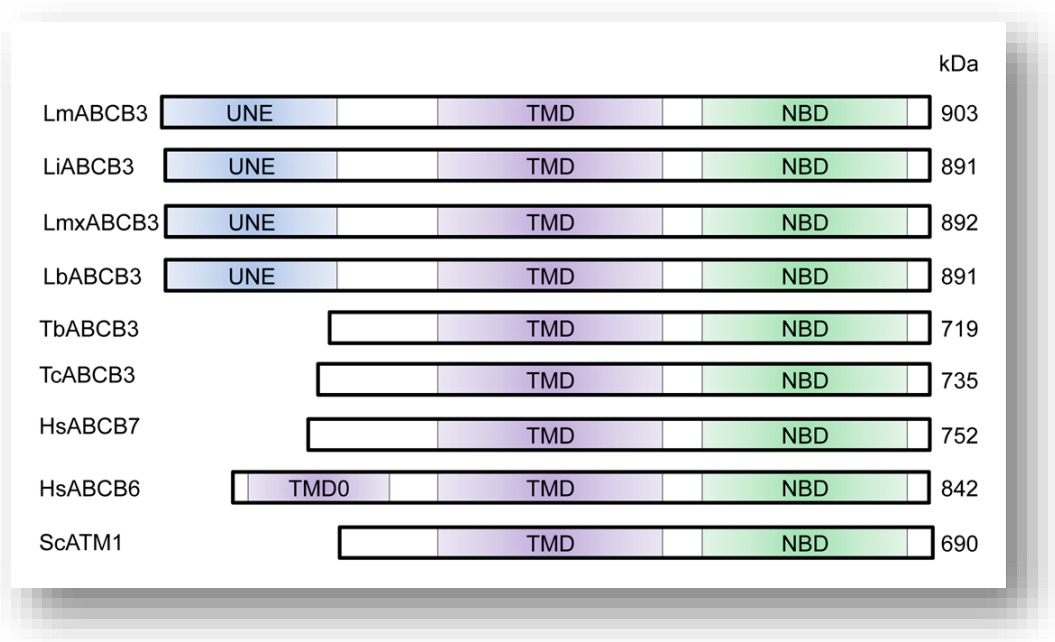
Sin embargo, una análisis exhaustivo del mRNA del gen LmABCB3<sup>246</sup> indicaba la presencia de dos codones ATG adicionales en fase (ATG<sub>-597</sub> y ATG<sub>-582</sub>), situados corriente arriba del ATG inicial anotado (ATG<sub>0</sub>) (figura 36).



**Figura 36. Representación esquemática del ARNm de LmABCB3.** En fase se encuentran los codones de inicio denominados como ATG<sub>-597</sub>, ATG<sub>-582</sub> y ATG<sub>0</sub> y el codón Stop TGA.

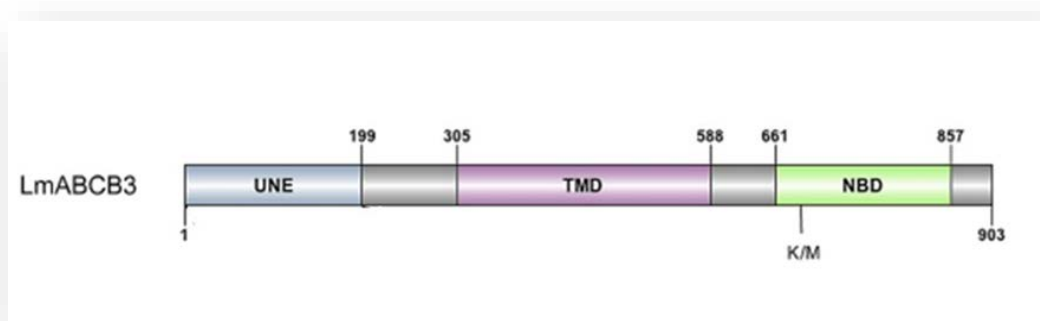
ATG<sub>-582</sub> se conserva en todos los genomas analizados de *Leishmania*, mientras que ATG<sub>-597</sub> se encuentra exclusivamente en *L. major*. Curiosamente,

ninguno de estos codones ATG corriente arriba están presentes en los genes sinténicos en los genomas de *T. cruzi* y *T. brucei* (figura 37).



**Figura 37. El dominio UNE es exclusivo de Leishmania ABCB3.** Representación esquemática de putativos transportadores mitocondriales ABCB que muestran la exclusiva Extensión N-terminal (UNE), el dominio transmembrana (TMD), el dominio de unión a nucleótidos (NBD) y el peso molecular teórico (kDa). Lm: *L. major*; Li: *L. infantum*; Lmx: *L. mexicana*; Lb: *L. braziliensis*; Tb: *T. brucei*; Tc: *T. cruzi*; Hs: *H. sapiens*; Sc: *S. cerevisiae*.

El uso del codón de ATG-597 predice un ORF de 2.709 nucleótidos, y codifica para una proteína de 903 aminoácidos con un peso molecular de 97.7 kDa, que contiene una extensión N-terminal única (UNE) de 20 kDa (figura 38).



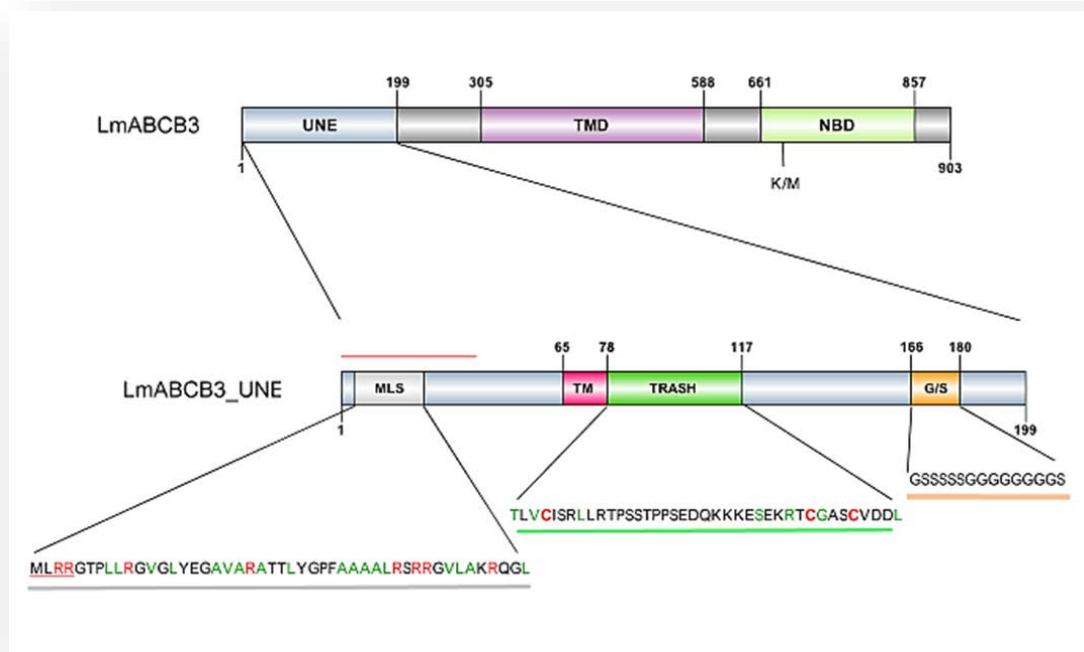
**Figura 38. LmABCB3 contiene una Extensión Única N-terminal (UNE).**

Esta región UNE incluye 199 aminoácidos con un punto isoelectrico (PI) teórico de 9.5, en contraste con el resto de la proteína, que es más ácida (PI de 5.9). Un análisis en la base de datos Blast utilizando la región UNE, mostró que ésta se encontraba exclusivamente en *Leishmania* ABCB3, y que no estaba presente en ninguna otra proteína ABC ni en ningún otro genoma secuenciado, incluidos los de los organismos *T. brucei* y *T. cruzi*. Del mismo modo, no hubo una similitud de secuencia significativa entre la región UNE y el dominio único TMD0 de HsABCB6.

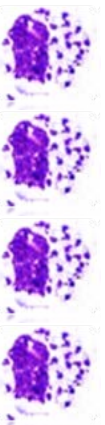
Además, aunque el análisis de predicción de estructura secundaria propuso una configuración principalmente helicoidal junto con regiones no estructuradas (posiblemente involucradas en interacciones proteína-proteína) no hemos podido encontrar un homólogo estructural para esta secuencia adicional en los diferentes programas de búsqueda<sup>247</sup>. Sin embargo, utilizando tanto un recurso de identificación de dominio (SMART<sup>248</sup>) como un algoritmo de predicción de estructura secundaria (Psipred<sup>249</sup>), se han identificado nuevas subregiones potenciales que nos pueden proporcionar datos acerca de función de esta extensión.

La secuencia de los aminoácidos 45 a 65 codifica para un posible segmento transmembrana según lo propuesto por MEMSAT3<sup>250</sup>, aunque este resultado no ha sido confirmado por otros programas de predicción de topología de membrana. Utilizando el algoritmo SMART, se identificó también un supuesto dominio de unión a metales (aminoácidos 78 a 117) que pertenece a la familia TRASH. El dominio TRASH contiene tres cisteínas conservadas, las cuales están implicadas en la coordinación de metales. Esta región está representada en LmABCB3 por las cisteínas 78, 105 y 109 (figura 39), y está descrito que pueden desempeñar papeles en la detección, regulación y tráfico de metales, así como en la resistencia a metales pesados<sup>251</sup>.

Por otra parte, se localizó una región de múltiples repeticiones de los aminoácidos glicina y serina (aminoácidos 166 a 180). Se han descrito repeticiones de aminoácidos similares con diversas funciones como componentes estructurales de proteoglicanos<sup>252</sup> o como secuencias bisagra en inmunoglobulinas<sup>253</sup>.



**Figura 39. Representación esquemática de LmABCB3** (arriba) que muestra la Extensión N-terminal Única (UNE), el dominio transmembrana (TMD) y el dominio de unión a nucleótidos (NBD), indicando la mutación K<sup>675</sup>M (K/M) en el motivo Walker A conservado que inactiva la proteína. La representación esquemática de la región UNE (abajo) destaca varios motivos y secuencias: i) un supuesto péptido señal (línea roja) de localización mitocondrial (MLS) con un motivo MLRR conservado (subrayado en rojo) y Argininas (rojo), así como residuos hidrófobos de Ala, Val y Leu (verde); ii) un supuesto segmento transmembrana (TM); iii) un dominio TRASH con Cys conservadas probablemente implicadas en la coordinación de metales (rojo) y otros residuos conservados en el 70% de los dominios TRASH (verde) y iv) repeticiones de glicina/serina.



Finalmente, se utilizó el software CLUSTALW<sup>254,255</sup> para hacer un análisis comparativo entre LmABCB3 y transportadores ABCBs mitocondriales representativos. Este análisis mostró un mayor grado de similitud con HsABCB6 (31.0% de identidad), HsABCB7 (29.3% de identidad) y ScATM1 (27.8% de identidad) y el más bajo (23.6-18.1% de identidad) con HsABCB8, HsABCB10, ScMDL1 y ScMDL2.

Un análisis filogenético de esta familia de proteínas confirmó que LmABCB3 pertenecía al grupo HsABCB6/7-ScATM1 (figura 40).

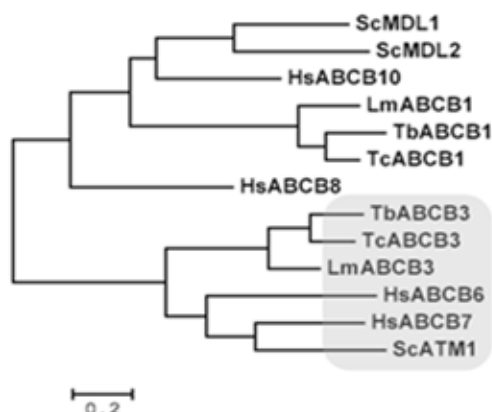


Figura 40. Análisis filogenético de secuencias transportadoras ABCBs mitocondriales de mamíferos, levaduras, *Trypanosoma* y *Leishmania*.

La identidad de secuencia de LmABCB3 con las proteínas que codifican para los genes sinténicos en *T. brucei* y *T. cruzi* fue del 45,7% y 49,0%, respectivamente.

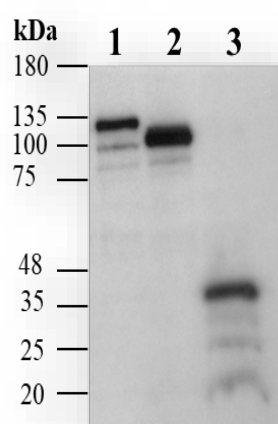
	LmABCB3	LmABCB1	TbABCB3	TbABCB1	TcABCB3	TcABCB1	HsABCB6	HsABCB7	HsABCB8	HsABCB10	ScATM1	ScMDL1	ScMDL2
LmABCB3	-	17.7	45.7	19.0	49.0	18.3	31.0	29.3	23.6	21.7	27.8	19.1	18.1
LmABCB1	34.2	-	21.2	59.6	21.9	66.9	19.0	22.7	27.5	31.0	21.2	31.2	25.3
TbABCB3	60.3	41.1	-	20.5	63.6	22.0	29.0	33.7	25.1	25.0	33.7	21.4	20.7
TbABCB1	35.6	77.3	41.4	-	20.1	68.6	20.7	20.6	28.1	29.6	20.9	30.3	26.1
TcABCB3	62.3	42.0	78.6	39.4	-	20.9	30.0	35.2	25.5	24.4	33.6	21.9	19.8
TcABCB1	34.8	83.4	41.3	84.5	41.4	-	19.8	20.3	27.4	30.5	22.0	31.0	26.1
HsABCB6	49.7	36.6	47.5	39.0	47.3	37.1	-	32.6	22.9	24.6	30.8	19.9	21.0
HsABCB7	48.2	39.5	55.9	40.5	56.1	40.5	51.5	-	24.3	23.7	41.8	20.1	21.4
HsABCB8	41.4	47.8	47.3	48.2	46.5	47.2	42.7	44.0	-	33.2	23.5	28.5	25.6
HsABCB10	39.9	50.9	43.5	50.8	43.4	50.8	43.3	43.2	54.7	-	24.6	35.7	30.8
ScATM1	47.7	42.9	56.9	44.4	56.7	43.9	50.0	62.7	47.0	46.1	-	23.3	20.8
ScMDL1	36.6	53.0	43.2	53.5	43.9	54.3	40.4	42.4	51.4	54.8	48.9	-	37.3
ScMDL2	37.5	43.8	40.3	46.1	41.3	44.1	41.3	44.0	46.6	51.8	42.5	57.3	-

**Tabla 14. Homología entre diferentes transportadores mitocondriales ABCB.** El análisis se realizó con Clustal W (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>). Las proteínas analizadas (número de acceso GenPept entre paréntesis) fueron de *Leishmania major*: LmABCB3 (XP\_001685635,1), LmABCB1 (XP\_001683806,1); *T. brucei*: TbABCB3 (XP\_829749,1), TbABCB1 (XP\_828146,1); *T. cruzi*: TcABCB3 (XP\_811319,1), TcABCB1 (XP\_820554,1); *H. sapiens*: HsABCB6 (NP\_005680), HsABCB7 (NP\_001258628,1), HsABCB8 (NP\_001269222,1), HsABCB10 (NP\_036221) y *S. cerevisiae*: ScATM1 (NP\_014030,1), ScMDL1 (NP\_013289,1) y ScMDL2 (NP\_015053,2). Los datos indican el porcentaje de identidad (gris) y de similitud (blanco) entre las secuencias de proteínas.



## 2. LmABCB3 se localiza en la mitocondria

El análisis de la región UNE predecía una secuencia MLRR en su extremo amino, rica en argininas y aminoácidos hidrófobos (alanina, valina y leucina). Esta secuencia MLRR es característica de las señales de localización mitocondrial encontradas en protozoos tripanosomátidos<sup>256,257</sup>; Por otro lado, un análisis teórico realizado con el software MitoProtII<sup>258</sup> indicó una mayor probabilidad de localización mitocondrial de LmABCB3 cuando se incluyó la región UNE (94,9% frente a 56,4%).

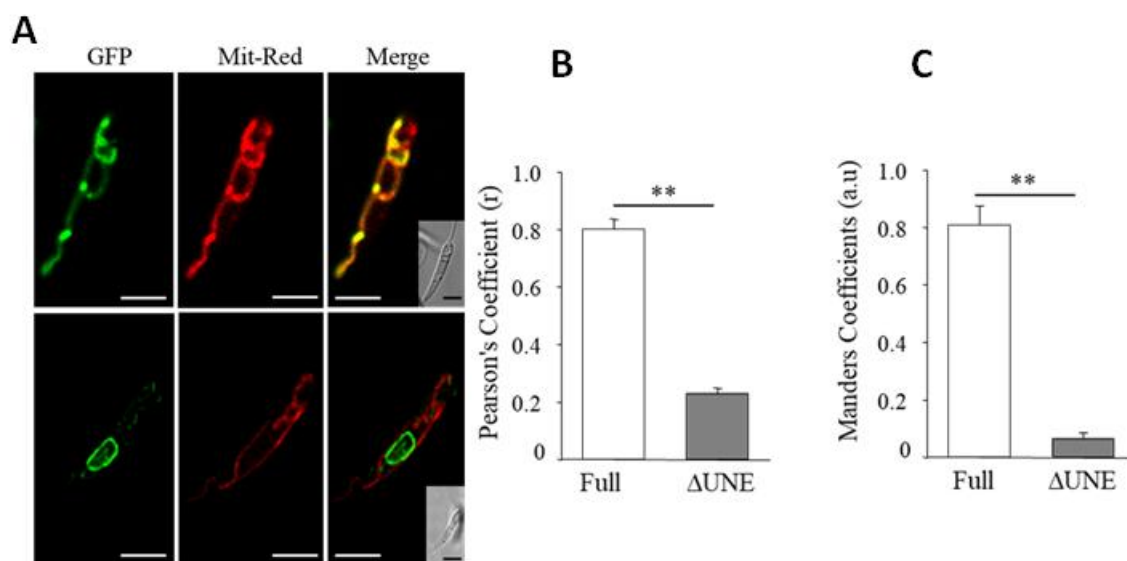


**Figura 41. Análisis de la expresión de LmABCB3-GFP y LmABCB3\_ΔUNE-GFP mediante Western blot.** Parásitos totales expresando la proteína LmABCB3-GFP (línea 1), LmABCB3\_ΔUNE-GFP (línea 2) ó GFP (línea 3). La inmunodetección se realizó con incubación del anticuerpo anti-GFP a una dilución 1: 5000. Los estándares de masa molecular (kDa) de Bio-Rad se indican a la izquierda.

Para confirmar esta predicción, se crearon quimeras de la proteína fusionada a la proteína verde fluorescente (GFP) en el extremo carboxilo terminal con y sin la región UNE. Se realizaron experimentos de microscopía confocal para evaluar la localización subcelular tanto de LmABCB3 de longitud completa (LmABCB3-GFP) como de una versión truncada que carece de UNE (LmABCB3\_ΔUNE-GFP). La expresión de ambas proteínas se confirmó mediante análisis de Western Blot utilizando anticuerpos frente a la GFP. La distribución celular de estas proteínas marcadas con GFP la comparamos con el marcador mitocondrial MitoTracker Red, y calculamos los coeficientes de co-localización (Pearson's y Mander's) tras la deconvolución de la imagen.



LmABCB3 co-localiza completamente con el marcador mitocondrial MitoTracker Red mostrando un índice de Pearson de  $0.80 \pm 0.03$ , a diferencia de LmABCB3\_ΔUNE (índice de Pearson  $0.23 \pm 0.01$ ) que no se localizó en este orgánulo. La exclusión de LmABCB3\_ΔUNE de las mitocondrias se evidenció por el índice de Mander, siendo éste de  $0.07 \pm 0.02$  en comparación con el índice de Mander para LmABCB3 completo ( $0.81 \pm 0.06$ ) (figura 42).

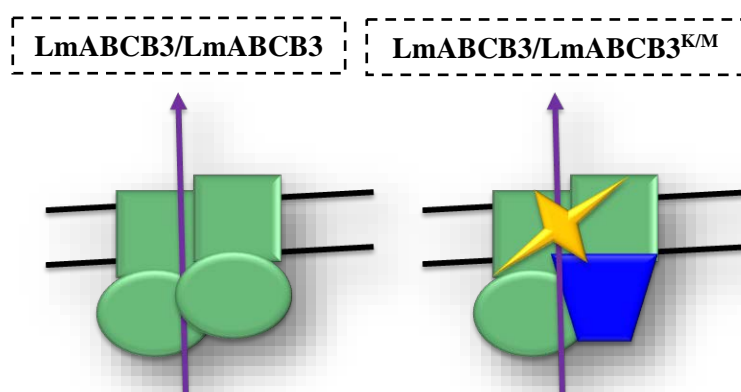


**Figura 42. La región UNE es necesaria para la localización mitocondrial de LmABCB3.** A) Localización subcelular de LmABCB3. Imagen representativa de promastigotes de *L.major* que expresan LmABCB3-GFP o LmABCB3\_ΔUNE-GFP (GFP), los cuales, fueron incubados con 50 nM de Mitotracker Red a 28°C durante 30 min. Las imágenes de Nomarsky se muestran en el recuadro. Barra de escala: 1 μm. B y C) Análisis cuantitativo de colocalización. El coeficiente de Pearson (B) se calculó para cada imagen desconvolucionada individual. Los coeficientes de Mander (C) se calcularon para definir M1 y M2 como la proporción de píxeles de un canal (M1 = verde, GFP) que se superponen con otro canal (M2 = rojo, Mit-Red). Ambos coeficientes se evaluaron usando "JACoP", un plugin de colocalización disponible en el software Fiji. LmABCB3-GFP; ΔUNE: LmABCB3\_ΔUNE-GFP. \*\* p < 0.001.

En conjunto, estos resultados indican que la región UNE era requerida para el tráfico apropiado de LmABCB3 a la mitocondria.

### 3. LmABCB3 es una proteína esencial para *Leishmania*

LmABCB3 se expresa constitutivamente en promastigotes de *L. major*<sup>246</sup>. Este hecho, junto con la necesidad de una dimerización específica de los ABCs half-transporters para ser funcionales, nos permitió intentar la regulación negativa de la actividad de LmABCB3 a través de un enfoque dominante-negativo, como se ha descrito previamente para LmABCG5<sup>158</sup> y LmABCG2<sup>195</sup>.



**Figura 43. Representación esquemática de la dimerización de los ABC half-transporters.** En el caso de LmABCB3, la sobreexpresión del dominante negativo (K/M) es letal para las formas promastigotes de *L. major*.

Para ello, introdujimos una mutación en la posición 675 (K675M, K/M) que elimina una lisina conservada dentro del motivo Walker A, conocida por ser crítica para la hidrólisis del ATP en transportadores ABC. Mutaciones similares, incluso si están presentes sólo en un dominio catalítico, inactivaron todas las proteínas ABC conocidas<sup>259</sup>.

Así, una vez obtenida y verificada mediante secuenciación la construcción que contenía la mutación LmABCB3<sup>K675M</sup> (figura 44), se transfectaron promastigotes de *L. major* con LmABCB3 de tipo salvaje (wt) o LmABCB3<sup>K/M</sup> mutado. Los parásitos transfectados con LmABCB3 wt fueron seleccionados y recuperados fácilmente tal y como se esperaba. Por el contrario, fue imposible obtener parásitos mutantes que expresaran LmABCB3<sup>K/M</sup> a pesar de que se realizaron más de ocho ensayos de transfección independientes.





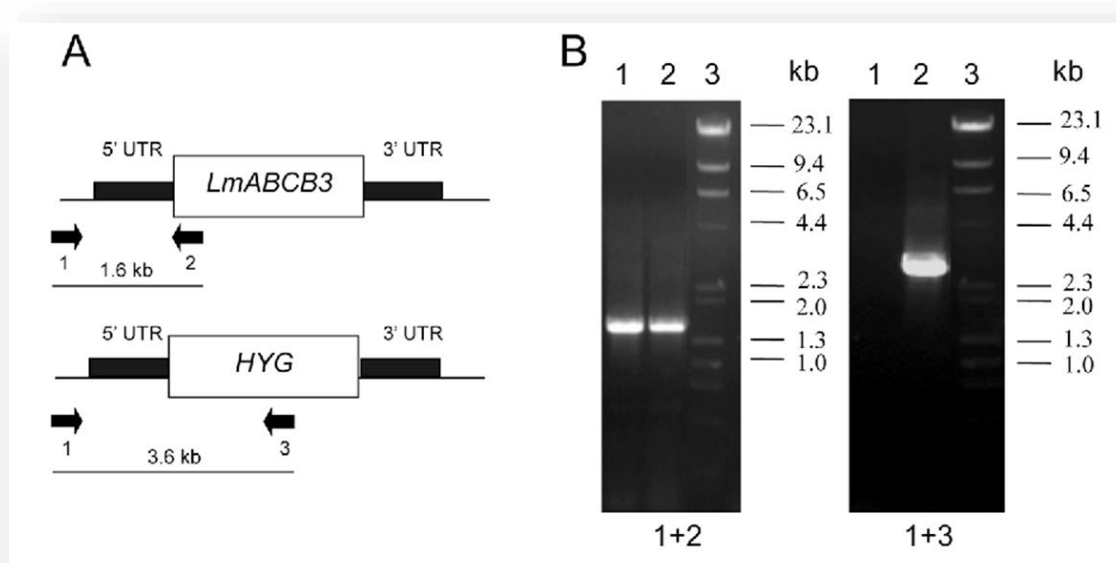
**Figura 44. Alineamiento donde se confirma la mutación de LmABCB3.**

Este resultado sugirió no sólo que la función de LmABCB3 era esencial para los promastigotes de *L. major*, sino también que los bajos niveles de dímeros de tipo salvaje funcional (wt) no eran suficientes para cubrir los requisitos del parásito.

#### **4. La delección heterocigota de un alelo de LmABCB3 reduce severamente la virulencia de *L. major***

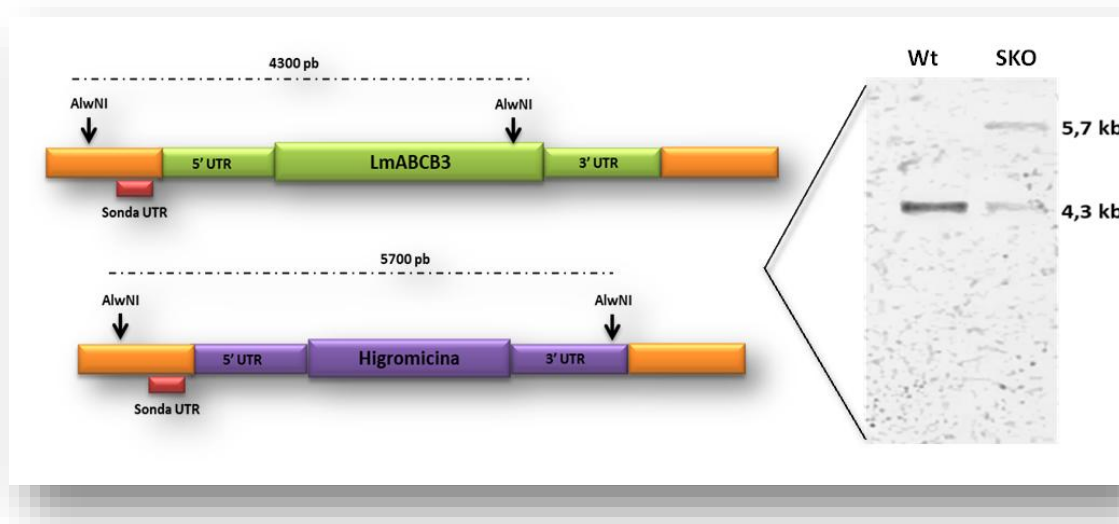
El hecho de no poder obtener mutantes “dominante negativos” nos sugería la idea de un posible papel esencial de LmABCB3 pero no nos permitió realizar ensayos funcionales adicionales. Por lo tanto, para poder seguir avanzando al respecto, decidimos tratar de generar parásitos knockout (KO) para el gen.

Para ello, en primer lugar, delecionamos un alelo del gen por recombinación homóloga para obtener una línea heterocigota *LmABCB3*<sup>+/-</sup>, siguiendo la estrategia descrita en el apartado 10 de materiales y métodos. Los parásitos se transfectaron con un cassette que contenía el gen de resistencia a higromicina linearizado, flanqueado por las secuencias 5'UTR y 3'UTR de *LmABCB3* (figura 45). Se obtuvo una población heterogénea de transfectantes tras la selección de parásitos con higromicina, por lo tanto, para obtener clones aislados, los cultivos se pasaron por placas de medio de cultivo con el fármaco de selección. Una vez obtenidos los clones independientes, se les aisló el ADN genómico y la adecuada inserción del cassette higromicina en el locus, se confirmó mediante PCR (figura 45). Para ello, se usó un oligonucleótido sentido (denominado 1) de la región 5'UTR del gen *LmABCB3* y un oligonucleótido reverso (denominado 3) del gen de la resistencia a higromicina. Únicamente los parásitos que contenían la delección (*LmABCB3*<sup>+/-</sup>) amplificaron dando un tamaño de 3,6 Kb.



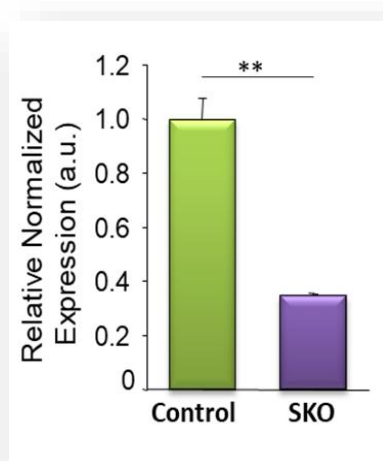
**Figura 45. Generación de promastigotes de *L. major* con un alelo de *LmABCB3* deletado. A)** Representación esquemática del locus *LmABCB3* y de la construcción conteniendo el gen de resistencia a higromicina utilizada para el reemplazamiento génico. Se indican los oligonucleótidos utilizados (flechas 1-3) para verificar el correcto reemplazamiento génico y los tamaños esperados de los productos amplificados por PCR. B) Análisis mediante PCR del locus de *LmABCB3* en promastigotes control y promastigotes *LmABCB3*<sup>+/-</sup>. Usando los oligonucleótidos 1 y 2, se obtuvo un amplicón de 1,6 Kb en los parásitos control (wt); El amplicón de 3,6 Kb generado tras usar los oligonucleótidos 1 y 3, confirmó el reemplazamiento génico por el cassette de higromicina en el locus de promastigotes *LmABCB3*<sup>+/-</sup> (SKO).

La inserción del cassette higromicina en el locus correcto también fue confirmada mediante Southern Blot (figura 46). Para ello, se extrajo ADN genómico de los parásitos control y *LmABCB3*<sup>+/-</sup>, y se realizó una digestión con la enzima de restricción *AlwNI* que cortaba dentro de la secuencia del gen pero no lo hacía dentro del cassette de higromicina. Los fragmentos de ADN digeridos con esta enzima se hibridaron con sondas específicas para la región 5'UTR. Como se puede observar en la figura 46, los perfiles obtenidos confirman que el cassette de higromicina se insertó de forma correcta sustituyendo uno de los alelos del gen *LmABCB3*.



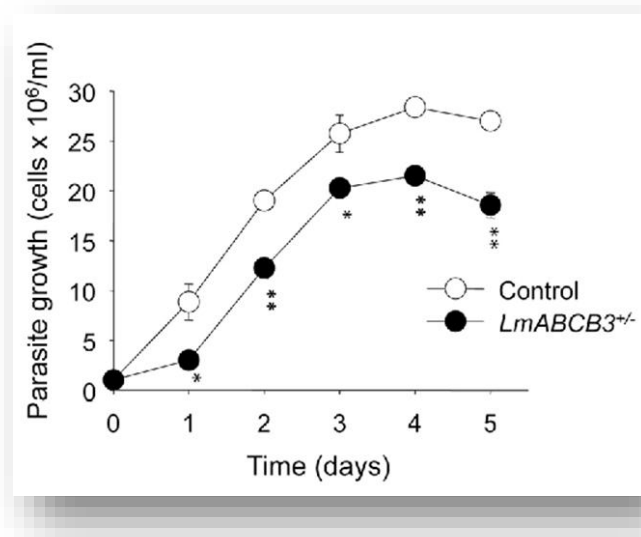
**Fig 46. Mapa de restricción en el locus de promastigotes wt y promastigotes *LmABCB3*<sup>+/-</sup>.** (Izda) Se muestran los sitios de restricción para *AlwNI* y las sondas para la región 5'UTR. (Dcha) Southern Blot que confirma la inserción del cassette higromicina en el locus correcto.

Finalmente, el análisis por PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) mostró una reducción aproximada del 60% en el nivel de ARNm de *LmABCB3* en células *LmABCB3*<sup>+/-</sup> (figura 47). Aunque la expresión génica en tripanosomátidos se regula postranscripcionalmente, este resultado sugiere una reducción en el nivel de proteína *LmABCB3* en los parásitos *LmABCB3*<sup>+/-</sup>, un punto que no pudo ser confirmado definitivamente debido a la ausencia de anticuerpos específicos. No se pudo obtener ninguna línea doble KO utilizando una estrategia similar con un segundo cassette de resistencia, a pesar de numerosos ensayos, probablemente debido al papel esencial de *LmABCB3*.



**Figura 47 Reducción de la expresión de *LmABCB3* en los parásitos *LmABCB3*<sup>+/-</sup>.** Los niveles de expresión de *LmABCB3* en promastigotes de *L. major* control y *LmABCB3*<sup>+/-</sup> se analizaron mediante qRT-PCR utilizando ARNm aislado de cada línea celular. \*\**p* < 0.001.

La reducción en la expresión de LmABCB3 se tradujo en una disminución del 30% ( $p < 0,001$ ) en el crecimiento de parásitos promastigotes (figura 48). Este resultado contrasta con el efecto letal del dominante negativo arriba descrito, lo que probablemente indica que el nivel de LmABCB3 funcional es mayor en los parásitos LmABCB3<sup>+/-</sup> que en los parásitos dominantes negativos.



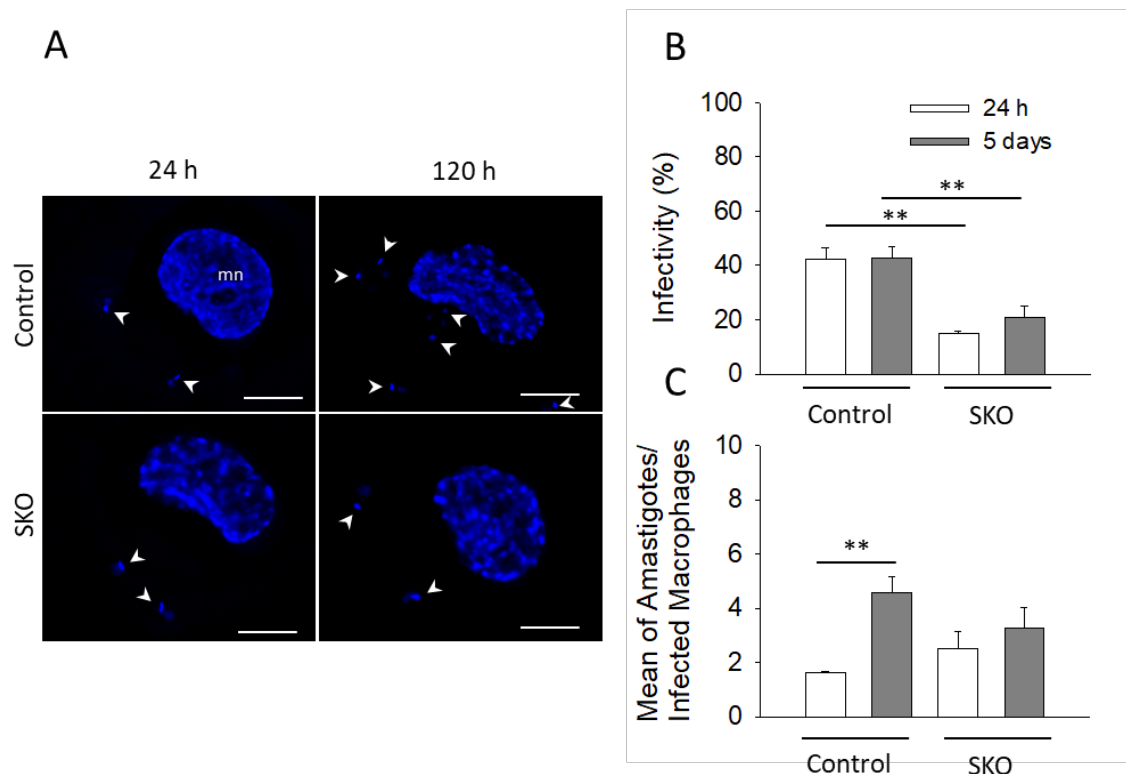
**Figura 48. Los parásitos LmABCB3<sup>+/-</sup> crecen como promastigotes axénicos.** Curva de crecimiento obtenida de un cultivo con promastigotes wt (círculos blancos) y promastigotes LmABCB3<sup>+/-</sup> (círculos negros) durante el tiempo indicado. Los resultados representan la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes.\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.001$ .



Para analizar la capacidad de los parásitos LmABCB3<sup>+/-</sup> de infectar macrófagos así como de replicarse como amastigotes intracelulares, se infectaron macrófagos THP-1 con promastigotes en fase estacionaria wt y LmABCB3<sup>+/-</sup>.

El porcentaje de macrófagos infectados y el número de amastigotes intracelulares se cuantificaron a las 24 y 120 h tras la infección. Aunque los parásitos LmABCB3<sup>+/-</sup> fueron capaces de infectar macrófagos (figura 49), lo hicieron con una tasa significativamente menor que los parásitos control (15 frente a 42%,  $p < 0,0002$ ). Además, durante los 5 días posteriores a la infección, el número de amastigotes intracelulares control aumentaron casi 3 veces (aumento de un 2,78,  $p < 0,0009$ ), mientras que los parásitos LmABCB3<sup>+/-</sup> no completaron un solo ciclo de replicación dentro de los macrófagos (aumento de 1,31 veces,  $p > 0,44$ ).





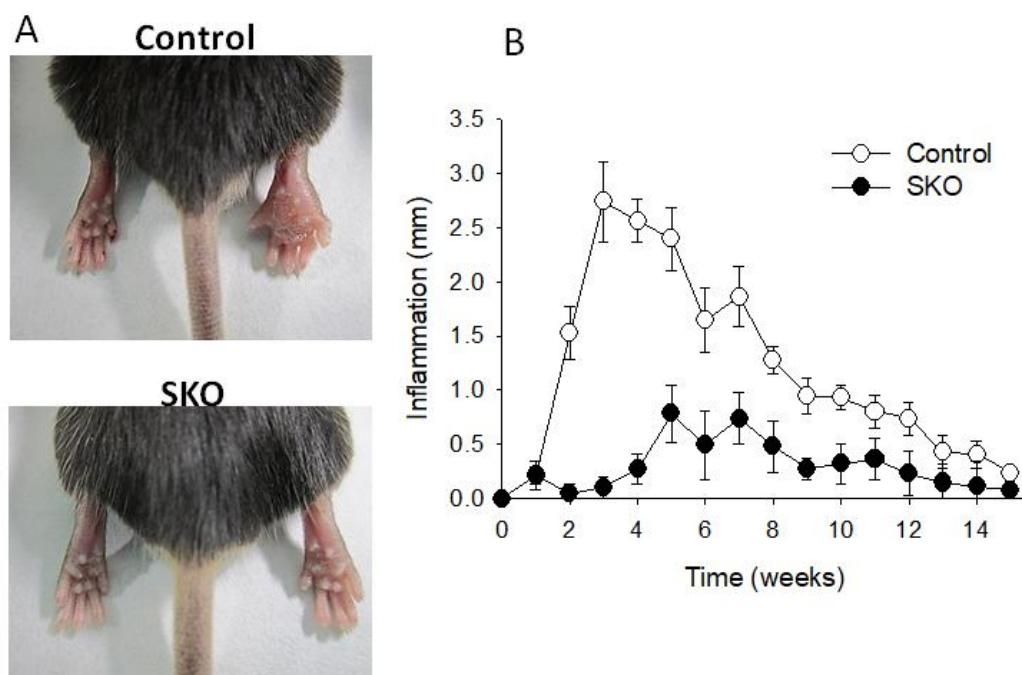
**Figura 49. Se requiere LmABCB3 para la replicación intracelular de amastigotes. A) Infección de macrófagos con parásitos control y *LmABCB3*<sup>+/-</sup>.** Imagen representativa de la infección de macrófagos THP-1 con promastigotes de *L. major* en fase estacionaria control y *LmABCB3*<sup>+/-</sup>. Las células se fijaron y se tiñeron con DAPI (azul). Los núcleos de los macrófagos (mn), el kinetoplasto y los núcleos de los amastigotes intracelulares (punta de flecha) están indicados. Barra de escala: 5  $\mu$ m. **B) Los parásitos *LmABCB3*<sup>+/-</sup> tienen una capacidad reducida para infectar macrófagos.** Los macrófagos THP-1 se infectaron con promastigotes control y *LmABCB3*<sup>+/-</sup> y se calculó el porcentaje de macrófagos infectados (n = 300 macrófagos/grupo). Los resultados mostrados son las medias  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes realizados por duplicado. \*\* p < 0.0002. **C) Los parásitos *LmABCB3*<sup>+/-</sup> no pueden replicarse como amastigotes intracelulares.** Los macrófagos THP-1 se infectaron con promastigotes control y *LmABCB3*<sup>+/-</sup> y se calculó el número promedio de amastigotes intracelulares por macrófago infectado en los momentos indicados. Los resultados mostrados son las medias  $\pm$  SEM. \*\* p < 0.0009.

Tras los resultados obtenidos en la infección de macrófagos THP1, donde los promastigotes *LmABCB3*<sup>+/-</sup> infectaron y se replicaron como amastigotes intracelulares con una tasa significativamente inferior a la de los controles, decidimos analizar si este fenómeno se correlacionaba con una menor virulencia de parásitos *LmABCB3*<sup>+/-</sup> en un modelo murino de leishmaniasis cutánea.



Para llevar a cabo este experimento, se infectaron ratones macho C57BL/6 con  $10^6$  promastigotes de *L. major* control y *LmABCB3*<sup>+/-</sup> por vía subcutánea en la almohadilla plantar de la pata trasera, como se indica en el apartado 16 de materiales y métodos. La inflamación de esta almohadilla se controló semanalmente durante 15 semanas (figura 50).

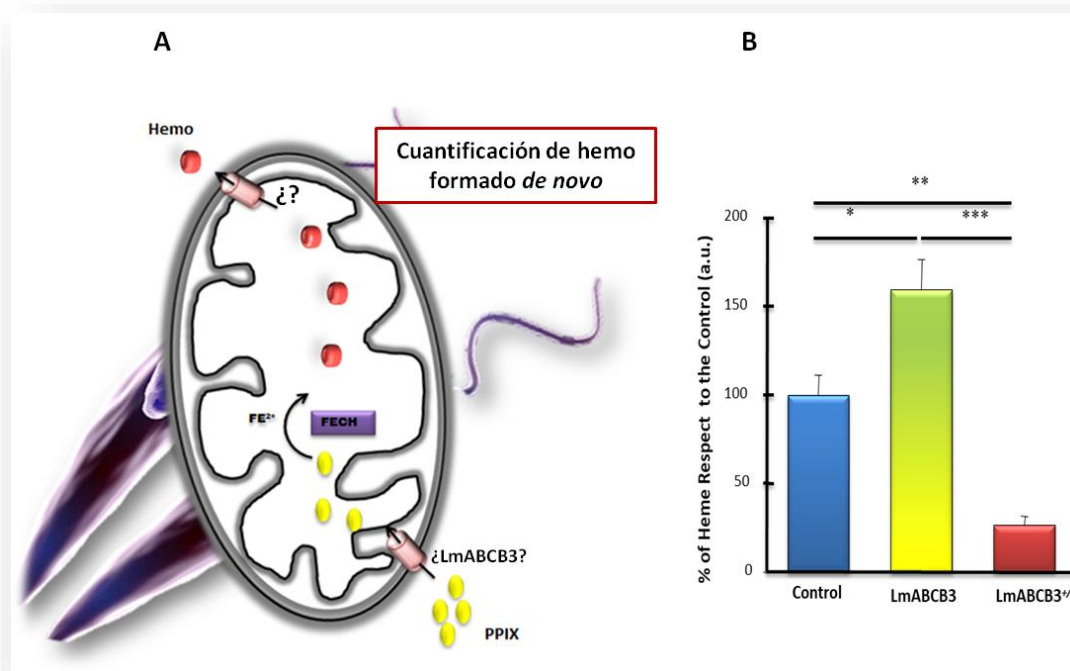
Los ratones infectados con parásitos control comenzaron a desarrollar inflamación progresiva y edema alrededor del sitio inyectado en la segunda semana, alcanzando un nivel máximo a las tres semanas, después de lo cual la almohadilla comenzó a recuperarse lentamente como se esperaba para este modelo. Por el contrario, los ratones infectados con parásitos *LmABCB3*<sup>+/-</sup> mostraron muy poca inflamación de la almohadilla plantar, con mínimas diferencias entre las almohadillas de las patas infectadas y las no infectadas.



**Figura 50. Infectividad de promastigotes wt y *LmABCB3*<sup>+/-</sup> en un modelo murino de leishmaniasis cutánea.** A) imágenes representativas de la inflamación de la almohadilla plantar tras 3 semanas de infección. B) Progresión de la inflamación medida de forma semanal (diferencia entre el grosor de la almohadilla de la pata inoculada y el grosor de la almohadilla de la pata contralateral de la pata no inoculada). Los valores representan las medias  $\pm$  SEM de 7 ratones.

## 5. LmABCB3 es requerido para la biosíntesis de hemo mitocondrial

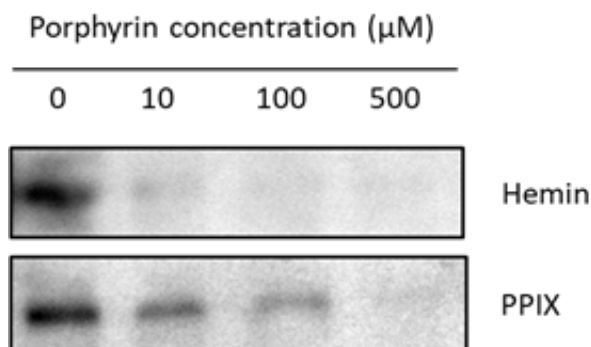
A continuación, analizamos si el papel esencial de LmABCB3 en *L. major* estaba relacionado con el tráfico mitocondrial de porfirinas, como ocurre con HsABCB6 en mamíferos<sup>245</sup>. Aunque *Leishmania* es auxótrofo para el grupo hemo, posee el gen de la ferroquelatasa (no presente en *Trypanosoma*)<sup>150</sup> que agrega un átomo de hierro al precursor PPIX en la matriz mitocondrial para generar hemo. Esto permite una cuantificación indirecta de la tasa de entrada de porfirina mitocondrial mediante la medición de la síntesis de hemo *de novo* a partir de PPIX exógeno<sup>158</sup> (Figura 51A).



**Figura 51. LmABCB3 es requerido para la biosíntesis de hemo mitocondrial. A) Esquema explicativo del ensayo realizado.** Los parásitos se incuban con PPIX, que podría ser transportado por LmABCB3 desde el citosol a la mitocondria, donde la ferroquelatasa le añade el hierro para formar hemo, que puede ser cuantificado y correlacionado con los niveles de LmABCB3. **B) Los niveles de LmABCB3 se correlacionan con la cantidad de hemo sintetizado a partir de PPIX exógeno.** La síntesis mitocondrial de hemo a partir de su precursor PPIX se midió como se describe en el apartado 17 de materiales y métodos tras la incubación de cada línea celular con PPIX 0,5 mM (Control: parásitos con niveles endógenos de LmABCB3; LmABCB3: parásitos que sobreexpresan LmABCB3; LmABCB3<sup>-/-</sup>: parásitos con un alelo del gen *LmABCB3* eliminado. Los resultados representan la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.02$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

Como se observa en la figura 51B, la sobreexpresión de LmABCB3 aumentó la cantidad de hemo sintetizado a partir de PPIX hasta un 60%. Por el contrario, la eliminación de un alelo de LmABCB3 disminuyó la cantidad de hemo *de novo* aproximadamente un 75% con respecto a los parásitos control.

También se estudió la capacidad de LmABCB3 para interactuar con hemo mediante un ensayo de precipitación (pulldown) con hemina-agarosa. Para ello, en primer lugar, se aislaron membranas de parásitos que expresaban LmABCB3-GFP y se solubilizaron con un detergente suave. Posteriormente, estas proteínas solubilizadas se incubaron con hemina-agarosa en ausencia o presencia de distintas concentraciones de hemina libre y PPIX. Tras lavar la agarosa, las proteínas precipitadas se separaron por SDS-PAGE y LmABCB3-GFP se visualizó por Western Blot usando un anticuerpo frente a la GFP. Como muestra la figura 52, LmABCB3-GFP interaccionaba con la hemina-agarosa, y esta interacción fue eficientemente inhibida por 10  $\mu$ M de hemina libre, a diferencia de la PPIX, que requirió una concentración alrededor de 50 veces mayor para lograr una inhibición similar. En conjunto, estos resultados proporcionan una clara evidencia de que LmABCB3 interacciona con hemo y afecta a la biosíntesis de hemo mitocondrial.



**Figura 52. LmABCB3 interactúa con hemo.** Las proteínas de membrana solubilizadas de parásitos *L. major* que sobreexpresan LmABCB3-GFP se sometieron a un ensayo de pull-down con hemina-agarosa en ausencia (0) o presencia de concentraciones crecientes de hemina libre (panel superior) o PPIX libre (panel inferior). LmABCB3-GFP se detectó mediante inmunotransferencia con anticuerpo anti-GFP (1: 5000).



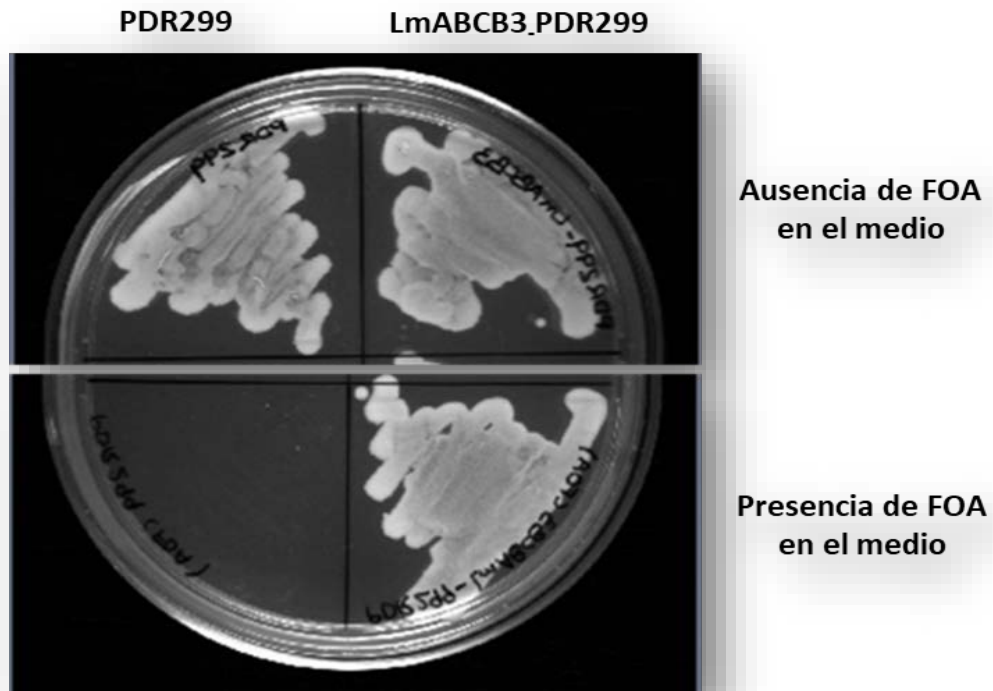
## **6. LmABCB3 es necesario para la maduración de clústeres hierro/azufre citosólicos**

Como hemos comentado con anterioridad, LmABCB3 también mostró similitud con HsABCB7. Esta proteína y su ortólogo en *S. cerevisiae*, ATM1, forman parte de la maquinaria de exportación ISC mitocondrial y son esenciales en la generación de ISC citosólicos<sup>180,181</sup>. Se ha demostrado que la eliminación del gen ATM1 causa un defecto drástico en el crecimiento de las levaduras, incluida la incapacidad de crecer en un medio mínimo y la imposibilidad de utilizar fuentes de carbono no fermentables<sup>260,261</sup>.

Dado la similitud que presenta LmABCB3 con HsABCB7 y ScATM1, quisimos analizar la capacidad de LmABCB3 para complementar la función de éste último en levaduras. Para ello, utilizamos levaduras KO para el gen ATM1 ( $\Delta$ ATM1) pero que lo contenían de manera ectópica en un plásmido con un marcador URA3 ( $\Delta$ ATM1/ATM1)<sup>262</sup>. Estas levaduras fueron transformadas con el plásmido de expresión de levaduras PDR299 que contenía LmABCB3 o con el mismo plásmido vacío, como control.

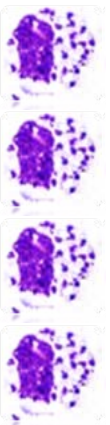
Una vez transformadas, ambas líneas ( $\Delta$ ATM1/ATM1/ABCB3 y  $\Delta$ ATM1/ATM1/ PDR299) se cultivaron en placas con medio de cultivo mínimo en presencia y ausencia de ácido 5'-fluoroorótico (FOA). Este compuesto se convierte en un derivado tóxico en cepas que expresan la proteína codificada por el gen URA3<sup>262</sup>, presente en el plásmido que contiene ATM1, lo que nos permitía curar las levaduras de la copia ectópica ATM1 y poder realizar ensayos de complementación con LmABCB3.

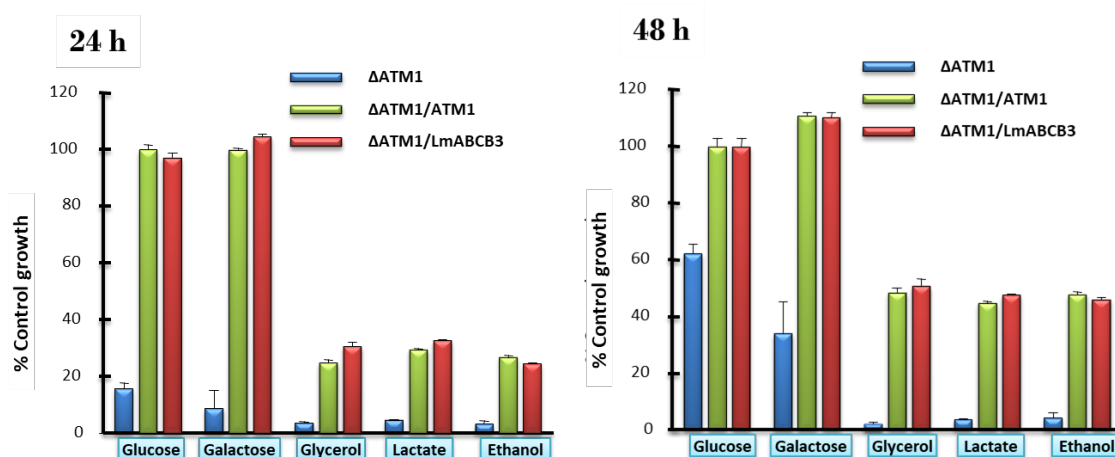
La figura 53 muestra cómo las levaduras  $\Delta$ ATM1 que han perdido la copia ectópica ATM1 (placas con FOA) y que han sido transformadas únicamente con PDR229 son incapaces de crecer, a diferencia de las células  $\Delta$ ATM1 que expresan LmABCB3 que crecían con normalidad, complementando funcionalmente ScATM1.



**Figura 53. LmABCB3 rescata por completo el fenotipo de defecto de crecimiento severo de levaduras que carecen de ScATM1.** Las células  $\Delta$ ATM1/ATM1/PDR299 (control) y  $\Delta$ ATM1/ATM1/LmABCB3 se sembraron en un medio mínimo con glucosa (SD) que contenía o no, 1 mg / mL de ácido 5'-fluoroorótico (FOA). Se incubaron a 30 °C durante tres días.

En paralelo, también evaluamos el efecto de LmABCB3 sobre el crecimiento de células  $\Delta$ ATM1 en medio rico en presencia de diferentes fuentes de carbono. Como se esperaba<sup>260,262</sup>, las levaduras  $\Delta$ ATM1 crecieron en fuentes de carbono fermentables (glucosa y galactosa) pero no lo hicieron en fuentes no fermentables de carbono (glicerol, lactato y etanol), mientras que las levaduras  $\Delta$ ATM1/ATM1 crecieron en ambas fuentes de carbono, fermentables y no fermentables. De manera interesante, la expresión de LmABCB3 fue tan efectiva como la de ScATM1 en la restauración del crecimiento de levaduras  $\Delta$ ATM1 tanto en fuentes de carbono fermentables como no fermentables (figura 54).

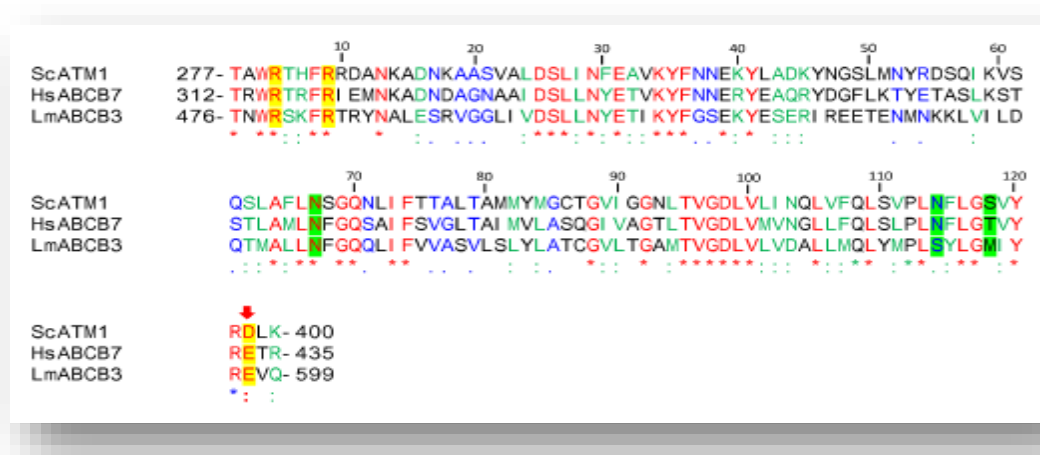




**Figura 54. LmABC3 rescata por completo el fenotipo de defecto de crecimiento severo de levaduras que carecen de ScATM1 tanto en fuentes de carbono fermentables como no fermentables.** Levaduras  $\Delta$ ATM1,  $\Delta$ ATM1/ATM1 y  $\Delta$ ATM1/LmABC3 se diluyeron en medio rico (YP) que contenía glucosa al 2% (p/v), galactosa al 3% (p/v), glicerol al 2% (v/v), lactato al 2% (p/v), o etanol 2% (v/v) a  $A_{600}$  0.05. Después de 24 y 48 horas de crecimiento a 30°C, se midió la absorbancia a  $A_{600}$ . El crecimiento se expresa en relación con el crecimiento de  $\Delta$ ATM1/ATM1 en medio rico en glucosa.

Estos datos demuestran la identidad funcional de LmABC3 con ScATM1 y HsABC7. Por lo tanto, LmABC3 funciona como un homodímero que se localiza en la membrana mitocondrial interna con el NBD en el lado de la matriz, y exportaría un sustrato requerido para la biogénesis de ISC citosólicos.

Recientemente, la estructura de ATM1 ha sido resuelta en *S. cerevisiae*<sup>182</sup> y en *Novosphingobium aromaticivorans*<sup>183</sup>. Estas proteínas se cristalizaron acomplejadas con GSH o grupos sulfuro (-XS), de acuerdo con el papel propuesto de ScATM1 en el transporte de complejos GSH-ISC<sup>263</sup> desde la mitocondria al citosol<sup>264</sup> (ver figura 22). GSH principalmente interactúa con ScATM1 formando enlaces de hidrógeno con los residuos R280, R284 y D398<sup>182</sup>. Curiosamente, estos residuos se conservan en HsABC7 (R315, R319 y E433) y LmABC3 (R479, R483 y E597)(Figura 53). Además, otros tres residuos de ScATM1 que se encuentran rodeando al GSH y participan en su interacción,<sup>182</sup> también se conservan generalmente en los tres transportadores.

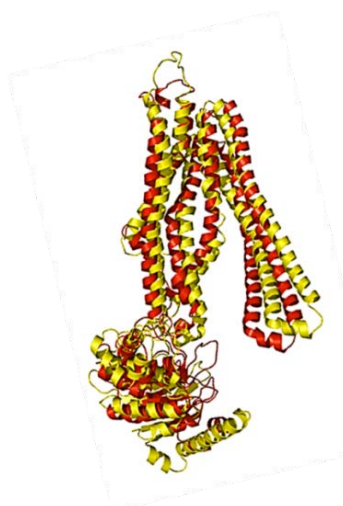


**Figura 55. Los residuos de ScATM1 que interactúan con el glutatión se conservan en LmABCB3.** El alineamiento de los aminoácidos indicados de *S. cerevisiae* (ScATM1), *H. sapiens* (HsABCB7) y *L. major* (LmABCB3) (software ClustalW), muestra que LmABCB3 comparte los residuos de ScATM1, formando enlaces hidrogenados con el GSH (resaltado en amarillo). Las mutaciones en el residuo E433 de HsABCB7 en pacientes con XLSA/A se indica con una flecha roja. Otros residuos de ScATM1 que rodean el GSH unido se resaltan en verde. Los aminoácidos idénticos (\*), fuertemente similares (:) y débilmente similares (.) están coloreados en rojo, verde y azul, respectivamente.

Para investigar más a fondo este hecho, analizamos la estructura 3D predicha de LmABCB3 mediante métodos de modelado computacional. Para ello, se construyó un modelo de LmABCB3 utilizando la secuencia sin la región UNE, que comprende los aminoácidos 283-875 (LmABCB3\_ΔUNE) utilizando el servidor bioinformático Phyre2<sup>247</sup>. Este programa, creó en primer lugar, un modelo de predicción de la estructura secundaria de la proteína y, luego, comparó su secuencia primaria y su estructura secundaria con la de proteínas de las cuales ya se conocían su estructura global (contenidas en la base de datos Protein Data Bank, PDB). El programa dibujó un modelo de estructura utilizando como molde uno de los homólogos estructurales de la proteína. El homólogo de LmABCB3 en levaduras, ScATM1, fue el elegido por el servidor por tener la estructura más cercana al modelo LmABCB3\_ΔUNE, con una similitud de secuencia del 40%.

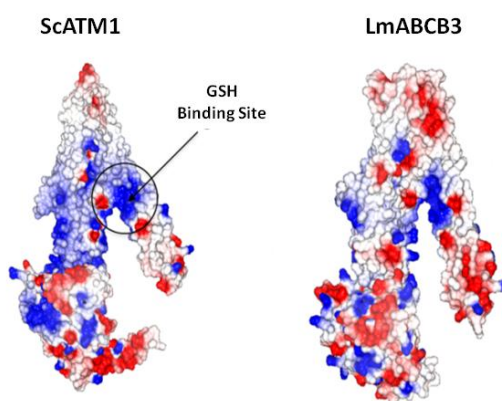






**Figura 56. Homología estructural entre LmABCB3 y ScATM1.** Se construyó un modelo para la estructura en 3D de LmABCB3\_ΔUNE. La estructura de la levadura ATM1 (código pdb: 4MHY) fue elegida por el servidor como la menos divergente con el modelo LmABCB3 construido con una similitud de secuencia del 40%. La superposición estructural en 3D de la estructura ScATM1 (representada como cintas amarillas) y el modelo LmABCB3\_ΔUNE (mostrado en cintas rojas) se realizó usando el servidor DALI.

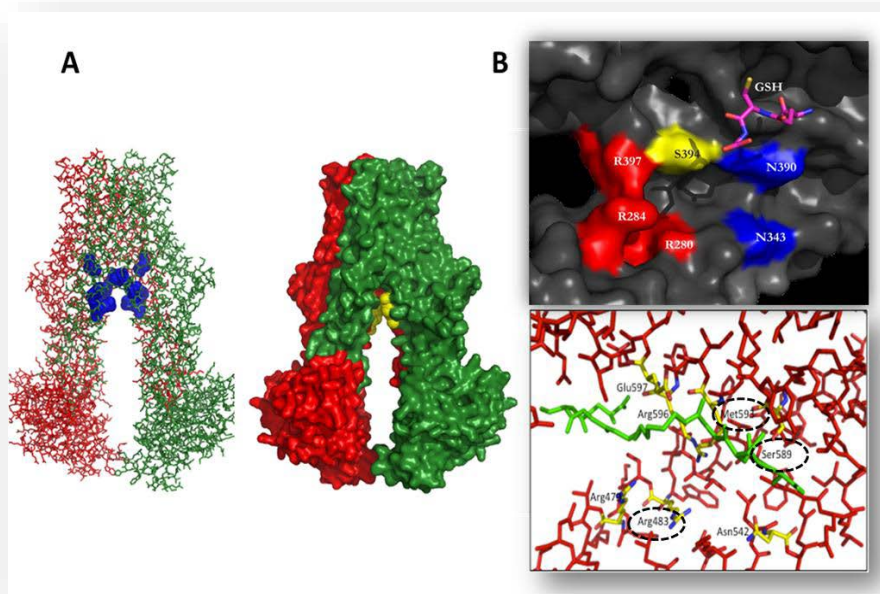
A continuación, se realizó una superposición en 3D con la estructura de ScATM1 (código de acceso PDB: 4MYH) y el modelo de LmABCB3\_ΔUNE, utilizando el servidor DALI (método fragmentario para construir alineamientos estructurales basados en contactar patrones de similitud entre secuencias problema)<sup>265</sup>, dando como resultado unos buenos parámetros de alineación por parejas (puntuación Z: 26,5; RMSD: 3,5 Å). En esta configuración, el sitio de unión del GSH en ScATM1 está ubicado en un bolsillo con carga positiva principalmente que corresponde a una cavidad similar en LmABCB3, la cual contiene residuos bien conservados orientados en posiciones equivalentes (figura 57).



**Figura 57. LmABCB3 conserva un bolsillo con carga positiva similar a la cavidad de unión al glutatión presente en ScATM1.** Representación de la distribución de las cargas electrostáticas de la superficie molecular en el modelo de ScATM1 y LmABCB3\_ΔUNE (color azul, cargas positivas; color rojo, negativas). En ScATM1, se destaca un bolsillo con carga positiva que se une a una molécula de GSH. También se observa una región positiva equivalente en el modelo LmABCB3 propuesto.



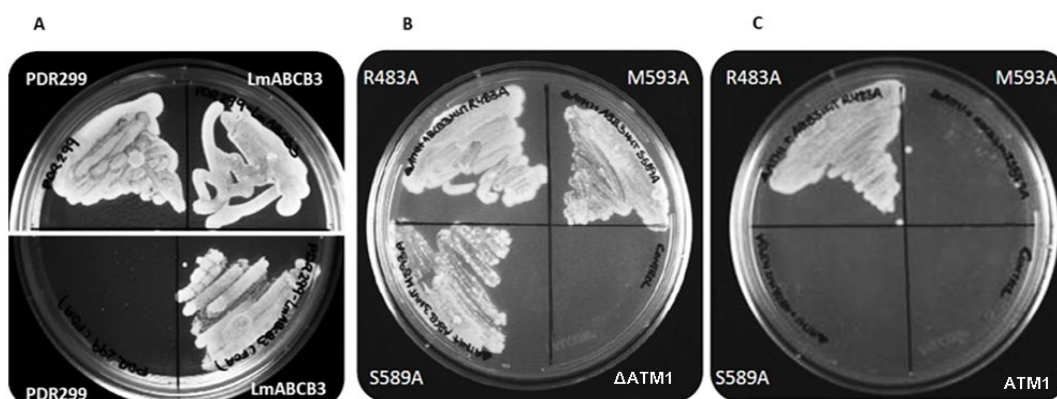
Dado que los parásitos tripanosomátidos poseen un metabolismo redox único que se basa principalmente en el **tripanotión** ( $T(SH)_2$ )<sup>266</sup>, una molécula que contiene dos GSH, planteamos la hipótesis de si LmABCB3 podría ser capaz de unirse al  $T(SH)_2$  del mismo modo en que lo hace el GSH a ScATM1. Para evaluar esta posibilidad, se simuló la interacción entre el modelo de LmABCB3\_ΔUNE y una molécula de tripanotión en estado reducido como posible ligando (figura 58) mediante cálculos de acoplamiento o docking a través del programa Autodock 4.2<sup>267</sup>. El análisis de datos predijo que la molécula  $T(SH)_2$  podría unirse al modelo de LmABCB3\_ΔUNE con un cambio de energía libre favorable. Curiosamente, la región de unión  $T(SH)_2$  en LmABCB3 está localizada cerca del bolsillo con carga positiva donde se produce la interacción del GSH en ScATM1. De manera significativa, un modelo de acoplamiento similar construido utilizando las coordenadas estructurales ScATM1 y GSH como ligando, predijo una interacción muy similar a la encontrada en la estructura ScATM1 ligada a GSH<sup>182</sup>.



**Figura 58. El modelo de homología de LmABCB3 comparte una región de unión a tiol con ScATM1.** A) Modelo del dímero LmABCB3\_ΔUNE con las cadenas A y B coloreadas en rojo y verde, respectivamente. Izda) Los residuos del sitio de unión  $T(SH)_2$  de ambos monómeros se resaltan en azul; dcha) Acoplamiento molecular del tripanotión reducido (dos moléculas de color amarillo) en la superficie molecular del modelo del dímero LmABCB3. B) Potencial sitio de unión al tripanotión. Arriba) Modelo de ScATM1; abajo) El  $T(SH)_2$  (color verde) rodeado por residuos conservados de LmABCB3 (amarillo) en la cavidad del modelo LmABCB3. Los residuos que se encuentran rodeados (R483, S589 y M593) son los residuos mutados que se detallan a continuación.

La interacción entre LmABCB3 $\Delta$ UNE y el tripanotio, se basa en un modelo computacional. Para corroborarlo, decidimos mutar algunos de los residuos involucrados en la supuesta interacción, y examinar la capacidad de estos mutantes de complementar la función de ScATM1.

De los seis residuos de LmABCB3 (R479, R483, N542, S589 y M593) que se encuentran mayormente conservados en ScATM1 y HsABCB7, se mutaron en primer lugar tres: **R483**, **S589** y **M593**. Para analizar si las mutaciones afectaban la capacidad de complementación en levaduras  $\Delta$ ATM1, repetimos el ensayo con FOA. Como se observa en la figura 57, los residuos S589 y M593 son esenciales para la función de LmABCB3, ya que los mutantes S589A y M593A no fueron capaces de complementar la función de ATM1. Contrariamente, la versión del gen que contenían la mutación R483A si fue capaz de complementar funcionalmente ScATM1, sugiriendo que no se trata de un residuo esencial para su función.



**Figura 59. Los mutantes de LmABCB3 S589A y M593A son incapaces de rescatar el fenotipo de defecto de crecimiento severo de levaduras que carecen de ScATM1.** A) Control del ensayo: las levaduras  $\Delta$ ATM1/ATM1 transformadas con el vector PDR299 vacío o conteniendo LmABCB3 se crecieron en ausencia de FOA (arriba) y presencia de FOA (abajo). B)  $\Delta$ ATM1/ATM1/LmABCB3<sup>R483/A</sup>,  $\Delta$ ATM1/ATM1/LmABCB3<sup>S589/A</sup> y  $\Delta$ ATM1/ATM1/LmABCB3<sup>M593/A</sup>, se sembraron en medio mínimo sin Trip con glucosa sin FOA y (C) con 1 mg / mL de FOA, y se incubaron a 30 °C durante tres días. Únicamente LmABCB3<sup>R483/A</sup> fue capaz de complementar por completo el fenotipo de defecto de crecimiento de levaduras Sc $\Delta$ ATM1. Además de un control del ensayo (A), se pusieron controles de crecimiento, en las placas B ( $\Delta$ ATM1, incapaz de crecer en medio mínimo) y C ( $\Delta$ ATM1/ATM1, incapaz de crecer en medio debido a la presencia de FOA).

## Discusión

---

Existe una necesidad urgente de encontrar nuevos tratamientos frente a enfermedades tropicales desatendidas. En los últimos años, la mitocondria de protozoos parásitos se ha convertido en una diana prometedora para nuevos enfoques terapéuticos<sup>265</sup>. Además de la respiración celular, este orgánulo desempeña papeles esenciales relacionados con la regulación de la homeostasis del hierro, incluida la síntesis y el tráfico de porfirinas y la generación de clústeres de hierro y azufre (ISC)<sup>268,269</sup>. Como el hierro es esencial en tripanosomátidos como *Leishmania*, la ruta que controla su uso es un blanco potencial para el desarrollo de fármacos<sup>270</sup>.

En mamíferos, se ha propuesto que dos ABCs mitocondriales de tipo half-transporters, ABCB6 y ABCB7, están involucrados en el transporte de porfirinas y en el ensamblaje de ISC, respectivamente<sup>173</sup>. En este trabajo describimos la caracterización funcional de una nueva proteína en *L. major*, LmABCB3, que muestra una similitud de secuencia significativa con ABCB6 y ABCB7 humanos.

Nuestros resultados sugieren que LmABCB3 probablemente funciona en la maduración de ISC citosólicos, de igual manera que ABCB7 en humanos, con el que comparte un 29.3% de identidad de secuencia. Así, LmABCB3 fue capaz de rescatar por completo el severo defecto de crecimiento de levaduras que carecen del gen ATM1, ortólogo a su vez de HsABCB7, incluido el crecimiento en un medio mínimo y la capacidad de usar fuentes de carbono no fermentables. Por lo tanto, estos resultados también sugieren que LmABCB3 funciona como un homodímero ubicado en la membrana mitocondrial interna, con los NBDs de cara a la matriz, similar a ScATM1 y HsABCB7<sup>263,271</sup>.

En mamíferos y levaduras, se ha propuesto que las proteínas tipo ABCB7/ATM1 transportan un complejo GSH-ISC<sup>263,271</sup> o cualquier otra molécula que contenga azufre y GSH<sup>264</sup> a través de la membrana interna mitocondrial, que luego se transferirá a la maquinaria citosólica CIA<sup>271</sup>.



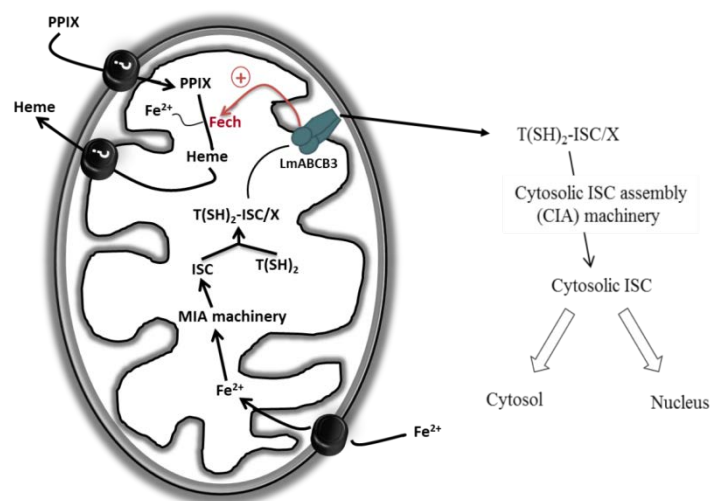
De hecho, los estudios estructurales con ScATM1 han demostrado que GSH se une a ScATM1 en un bolsillo con carga positiva<sup>182</sup>, que corresponde a una cavidad similar en el modelo computacional de LmABCB3, en el que la mayoría de los residuos implicados en la unión a GSH están completamente conservados. Uno de ellos, ScATM1<sup>D398</sup>, que corresponde a LmABCB3<sup>E597</sup>, forma enlaces de hidrógeno con GSH en ScATM1. Curiosamente, esta mutación en humanos, HsABCB7<sup>E433</sup>, provoca anemia sideroblástica ligada al cromosoma X con ataxia (XLSA/A)<sup>272</sup>, un síndrome raro con complicaciones neurológicas, que pone de la importancia de la interacción con el grupo tiol (-SH).

Los parásitos tripanosomátidos poseen un único sistema redox basado en el tripanotión (T(SH)<sub>2</sub>), que es el principal tiol y sustituye al glutatión (GSH). Este ditiol específico para el parásito se sintetiza mediante la adición de dos moléculas de GSH a la espermidina y reemplaza el omnipresente sistema GSH en el mantenimiento de la homeostasis redox y la desintoxicación xenobiótica<sup>266</sup>. Los análisis de acoplamiento molecular o docking indican que T(SH)<sub>2</sub> podría interactuar con LmABCB3 de forma similar a como lo hace GSH con ScATM1. Esto sugiere que LmABCB3 podría transportar un complejo T(SH)<sub>2</sub>-ISC, o cualquier otra molécula que contenga T(SH)<sub>2</sub>, fuera de la mitocondria para la maduración citosólica y nuclear de clústeres Fe/S, lo que apoya aún más la relación propuesta entre el metabolismo tiol-redox y el hierro en estos organismos<sup>273</sup>. La determinación de si este modelo computacional es preciso o no, requerirá la elucidación de la estructura de LmABCB3, pero mientras tanto abre una nueva perspectiva en la comprensión de la función de LmABCB3.

Además de su papel en el ensamblaje de ISC citosólicos, nuestros datos describen claramente una actividad de LmABCB3 relacionada con el metabolismo del hemo. Encontramos que LmABCB3 puede unirse a hemo, y que los niveles de proteína LmABCB3 se correlacionan con la tasa de producción de hemo mitocondrial a partir de PPIX citosólica. Este papel no es compartido por ScATM1 ya que tanto la síntesis como el transporte de hemo son funcionales en la levadura  $\Delta$ ATM1<sup>260,274</sup>.

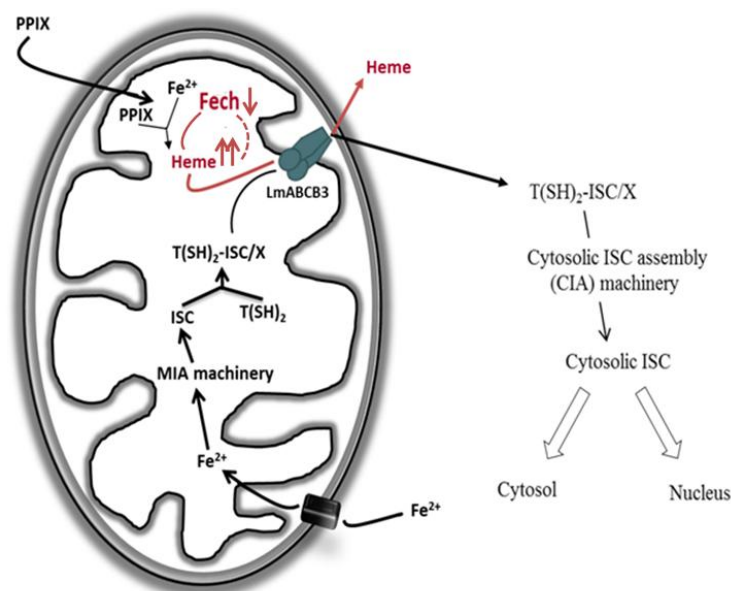
LmABCB3 podría desempeñar un papel en el metabolismo del hemo similar al de ABCB6 humano, el cual se requiere para la importación de porfirinas a la mitocondria, y con el que comparte el nivel más alto de similitud de secuencia (31%) de los transportadores ABC mitocondriales conocidos. Sin embargo, la capacidad de LmABCB3 para complementar funcionalmente la delección ATM1 en levaduras, indica que es probable que el transportador se oriente con los NBDs orientados de cara a la matriz de la membrana interna mitocondrial. Esta orientación predice una probable función de exportación, mientras que ABCB6 se ha descrito como un importador de porfirinas<sup>175</sup>.

Alternativamente, el efecto de LmABCB3 sobre la biosíntesis de hemo podría reflejar una interacción esencial con la ferroquelatasa, como se ha demostrado para el ABCB7 humano. Experimentos *in vitro* e *in vivo* han demostrado que la región carboxi-terminal de la ferroquelatasa interactúa con ABCB7, y la expresión transitoria de ABCB7 da como resultado un aumento en la actividad enzimática y el nivel de expresión de ferroquelatasa, contribuyendo a la producción de hemo durante la diferenciación de las células eritroides<sup>275</sup>. Por lo tanto, la disminución de LmABCB3 en los parásitos LmABCB3<sup>+/-</sup> provocaría una menor actividad ferroquelatasa y una menor formación de hemo, mientras que la sobreexpresión del gen aumentaría la actividad ferroquelatasa, incrementando la síntesis de hemo (figura 60).



**Figura 60. Hipótesis nº1 propuesta para explicar el papel de LmABCB3 en el metabolismo de hemo.**

Los resultados también podrían explicarse si LmABCB3 exportara hemo formado *de novo* desde la mitocondria hasta el citosol, con una menor capacidad para transportar PPIX, por lo que los niveles aumentados de hemo mitocondrial en células LmABCB3<sup>+/-</sup> podrían inhibir la actividad ferroquelatasa (figura 61). Respalando esto, se explicaría el hecho de que se requiera alrededor de 50 veces más PPIX que hemina para competir con la interacción de LmABCB3 con hemina-agarosa. Además, a concentraciones que pueden ser fisiológicamente relevantes, se ha demostrado que el hemo inhibe la ferroquelatasa de mamífero de una manera no competitiva con respecto al hierro<sup>276,277</sup>. Para demostrar esta hipótesis, se requerirían ensayos de transporte directo de porfirinas con vesículas reconstituidas con LmABCB3.



**Figura 61. Hipótesis n°2 propuesta para explicar el papel de LmABCB3 en el metabolismo de hemo.**

El hemo y los ISC son cofactores requeridos por una amplia variedad de enzimas esenciales implicadas en el transporte de electrones, la catálisis enzimática y la regulación de la expresión génica, por lo tanto, la capacidad de sintetizarlos u obtenerlos del huésped es absolutamente esencial para el crecimiento de parásitos tripanosomátidos<sup>150,278,279</sup>.



LmABCB3 tiene un papel en el metabolismo del hemo y de los ISC, y en este trabajo proporcionamos numerosas evidencias que demuestran que estas funciones son esenciales para la supervivencia de los parásitos tripanosomátidos.

En primer lugar, la inhibición de LmABCB3 a través de la sobreexpresión de un dominante negativo es letal para el parásito. Esta estrategia ha sido empleada para estudiar la función en otros ABCs half-transporters, aprovechado el requerimiento de dimerización para ser funcionales<sup>158,195,269</sup>. Sin embargo, hasta donde sabemos, este es el primer caso de un fenotipo tan dramático debido al efecto del dominante negativo, lo que indica que el bajo nivel de dímeros Wt/Wt LmABCB3 funcionales esperados usando esta estrategia no es suficiente para permitir el crecimiento del parásito. En segundo lugar, aunque la delección heterocigota de un alelo *lmABCB3* altera ligeramente el crecimiento de los promastigotes, previene la replicación de *L. major* dentro de los macrófagos. Aunque se intentó en múltiples ocasiones, no se pudo obtener una doble línea KO, presumiblemente debido a su efecto letal. La aplicación de la nueva tecnología de Crispr-Cas9 para deleccionar LmABCB3 en ausencia o presencia de una copia ectópica de LmABCB3 permitirán confirmar definitivamente esta esencialidad. De acuerdo con un papel esencial de LmABCB3 en amastigotes intracelulares, la eliminación de un alelo LmABCB3 reduce severamente la virulencia del parásito en un modelo murino de leishmaniasis cutánea.

Por lo tanto, a pesar de que los bajos niveles de LmABCB3 permiten el crecimiento de promastigotes de LmABCB3<sup>+/+</sup>, no son suficientes para que los amastigotes intracelulares causen enfermedad en ratones. Aunque no se ha explorado en *Leishmania* la participación de proteínas que contengan ISC y/o hemo en la virulencia del parásito, este efecto diferencial en ambas etapas del parásito (amastigote y promastigote) podría explicarse por un papel más relevante de la maquinaria involucrada en los ISC citosólicos y/o en el metabolismo del hemo en un escenario amastigote. De hecho, los promastigotes no requieren producir hemo, ya que lo toman del medio de cultivo<sup>280</sup>, mientras que se ha sugerido que los amastigotes intracelulares podrían tomar coproporfirinógeno, un precursor del hemo del macrófago<sup>280,150</sup>.



En contraposición, los resultados de RIT-seq (RNA interference –RNAi- target sequencing) en *T. brucei*<sup>281</sup> sugieren que la *downregulation* de TbABCB3 no afecta a la proliferación celular ni en las formas sanguíneas ni en las etapas de tripomastigotes procíclicos. Estos resultados se confirmaron mediante ensayos de ARNi de TbABCB3 (o TbATM1), que se publicaron durante la revisión del manuscrito describiendo la caracterización de LmABCB3. TbABCB3 complementa parcialmente con ATM1, su interferencia produjo un defecto de crecimiento moderado y dio como resultado la reducción de las actividades enzimáticas dependientes de Fe/S citosólicas pero no mitocondriales. Sin duda los resultados son bastante inesperados, ya que, a pesar de que *Trypanosoma* no sintetiza hemo a partir de precursores, se requiere ISC citosólicos para sobrevivir<sup>190</sup>.

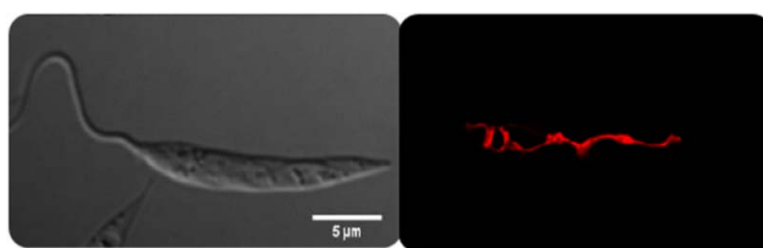
En cualquier caso, la esencialidad de LmABCB3 para la virulencia del parásito puede convertirla en una posible diana terapéutica. En colaboración con la empresa GlaxoSmithKline vamos a empezar a buscar inhibidores de este transportador aprovechando el sistema de complementación funcional en levaduras. La idea es llevar a cabo un cribado de alto rendimiento (*High Throughput Screening*o HTS) dirigido a diana (LmABCB3) pero dentro de un contexto celular eucariota (levaduras). Esta aproximación podría evitar los inconvenientes de los ensayos fenotípicos, en los que no se conoce la diana, y de los ensayos dirigidos a diana, que suelen requerir la purificación de la proteína diana que carece por lo tanto de un contexto celular, algo especialmente importante para una proteína de membrana. Este tipo de aproximaciones se han propuesto como una alternativa buena y barata para buscar fármacos frente a enfermedades olvidadas<sup>282–284</sup> y, de hecho, ha sido utilizada con éxito para buscar inhibidores de las proteínas HRG de tripanosomátidos (Cabello-Donayre y colaboradores; manuscrito en preparación).

Finalmente, un análisis detallado del transcrito de ARNm de LmABCB3<sup>246</sup> predice una topología inusual que incluye una región UNE que no se encuentra en ninguna otra proteína fuera del género *Leishmania*. Esta extensión única incluye un motivo consenso MLRR seguido de una región hidrofóbica rica en Ala, Leu y Val, que se ha propuesto necesaria para el reconocimiento y la importación mitocondrial de parásitos tripanosomátidos<sup>256</sup>.



Nuestros resultados han confirmado que la región UNE es necesaria para la correcta localización de LmABCB3 en la mitocondria. Curiosamente, también se prevé que la UNE contenga un dominio de unión a metales (dominio TRASH), con residuos de cisteína altamente conservados que probablemente estén implicados en la coordinación de metales<sup>252</sup>. El papel exacto de este dominio TRASH en LmABCB3 aún no se ha dilucidado, pero la posibilidad de que la funcionalidad de la proteína pueda ser modulada por metales como el hierro es muy atractiva. Para intentar elucidar su función, pretendemos estudiar su capacidad para unir metales. Para ello, en primer lugar expresaremos en los parásitos tanto la región UNE salvaje como una versión con las tres cisteínas mutadas (Cys<sup>-</sup>), fusionadas a la GST para facilitar su purificación. Posteriormente, purificaremos la UNE y la UNECys<sup>-</sup> y estudiaremos la posible presencia de metales unidos mediante espectrometría de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES). Mediante esta técnica, también analizaremos la capacidad de la UNE y de la UNECys<sup>-</sup> purificadas, de unir metales *in vitro*. En paralelo, gracias a la colaboración con la Dra. Ute A. Hellmich (Universidad de Johannes Gutenberg, Alemania), trataremos de obtener información sobre la estructura y dinámica de ambas proteínas (Wt y Cys<sup>-</sup>) mediante resonancia magnética nuclear de proteínas, en presencia y ausencia de metales.

Hasta la fecha hemos mutado las tres cisteínas conservadas de la región UNE. Resultados preliminares usando quimeras con mCherry (C-terminal) demuestran que estas mutaciones no afectan a su localización mitocondrial (figura 62) y que la sobreexpresión de UNE wt o UNECys<sup>-</sup> no fue tóxica para los parásitos.



**Figura 62. Localización subcelular de LmUNECys<sup>-</sup>-mCherry**

Por otra parte, estas cys conservadas en UNE no afectan a la capacidad de LmABCB3 de complementar la función de ATM1 en levaduras ScΔATM1 (dato no mostrado).

En conclusión, en esta tesis hemos llevado a cabo la caracterización funcional de LmABCB3, un transportador ABC mitocondrial en *L. major*. Hemos mostrado que LmABCB3 desempeña un papel fundamental tanto en la biogénesis mitocondrial de hemo como en la de los ISC citosólicos, lo que explicaría su esencialidad. La naturaleza única del péptido N-terminal de 20 kDa, que incluye su requerimiento de importación mitocondrial y la presencia de un dominio TRASH, lo convierten en un candidato muy interesante para el desarrollo de inhibidores específicos que podrían ser usados frente a *Leishmania*.



## **BLOQUE II**

# **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS COMPUESTOS  
ACTIVOS FRENTE A *T.BRUCI*

**Estudio de la actividad tripanocida *in vitro* de la bacteriocina AS-48 y caracterización de su mecanismo de acción**

## **AS-48 es eficaz frente a *Trypanosoma brucei* e induce una muerte celular relacionada con autofagia en el parásito**

Los resultados del siguiente capítulo forman parte del artículo:

***“Autophagic-related cell death of Trypanosoma brucei induced by bacteriocin AS-48”.***

Publicados en Int J Parasitol Drugs Drug Resist. 2018.

### **Resumen**

---

El protozoo parásito *Trypanosoma brucei* es el agente causal de la tripanosomiasis africana humana (enfermedad del sueño) y del nagana. Las terapias farmacológicas actuales tienen una eficacia limitada, una alta toxicidad y se ven continuamente obstaculizadas por la aparición de resistencias.

Los péptidos antimicrobianos son las moléculas efectoras del sistema inmune innato, cuyas familias se encuentran en casi todos los organismos, desde bacterias hasta mamíferos. Son una familia de sustancias polifacéticas que presenta baja generación de resistencias, un amplio espectro antimicrobiano y múltiples mecanismos de acción. Es por este motivo, que han atraído la atención como posibles compuestos parasiticidas.

En este capítulo, exploramos la capacidad de AS-48 para matar las formas sanguíneas clínicamente relevantes de *T. brucei* (*T. brucei gambiense*, *T. brucei rhodesiense* y *T. brucei brucei*), presentando una mayor actividad *in vitro* que los fármacos actualmente utilizados y no presentando ningún signo de toxicidad en células de mamíferos. Por ello, AS-48 podría ser un candidato prometedor en el tratamiento de la enfermedad del sueño y del nagana.

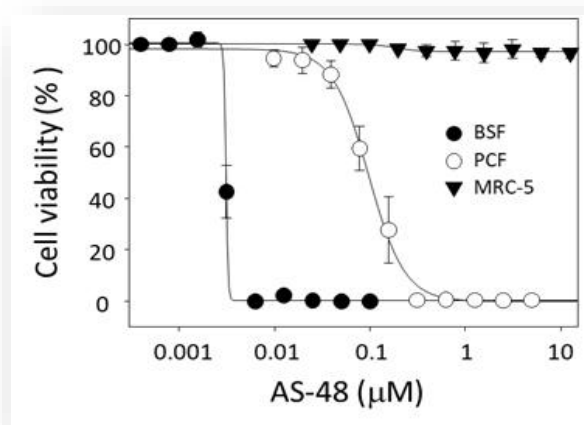
Durante el transcurso de la escritura del artículo *“Autophagic-related cell death of Trypanosoma brucei induced by bacteriocin AS-48”*, trabajo que se presenta en esta tesis, salió publicado el artículo *“Enterocin AS-48 as Evidence for the Use of Bacteriocins as New Leishmanicidal Agents”*<sup>229</sup> en el que se describe el efecto de esta bacterocina en *Leishmania*.

## Resultados

### 1. Actividad tripanocida de la bacteriocina AS-48

La actividad de AS-48 fue determinada mediante el ensayo de viabilidad celular Alamar Blue frente a las distintas formas de *T. brucei*. Para ello, los parásitos fueron incubados en presencia de concentraciones crecientes de la bacteriocina durante 72 h a la temperatura óptima de crecimiento (28°C para las formas procíclicas y 37°C para las formas sanguíneas) en medio de cultivo suplementado con 10% de hiFBS. Como muestran la figura 63 y la tabla 15, AS-48 es activa en un rango de concentración nanomolar, siendo la EC<sub>50</sub> (concentración efectiva media) para las formas sanguíneas del parásito de  $1.70 \pm 0.19$  nM para *T. b. rhodesiense*,  $2.61 \pm 0.08$  nM *T. b. gambiense* y de  $3.12 \pm 0.15$  nM para *T. b. brucei*. AS-48 también mostró actividad frente a las formas procíclicas de *T. b. brucei*, pero a una concentración 45 veces mayor que la requerida para las formas sanguíneas (EC<sub>50</sub>=140 ± 57 nM) (figura 63 y tabla 15).

Por el contrario, no se observó ningún efecto citotóxico frente a MRC-5 (control), una línea celular humana no tumoral ampliamente utilizada como control de toxicidad de fármacos, a la mayor concentración ensayada (12,5 µM).



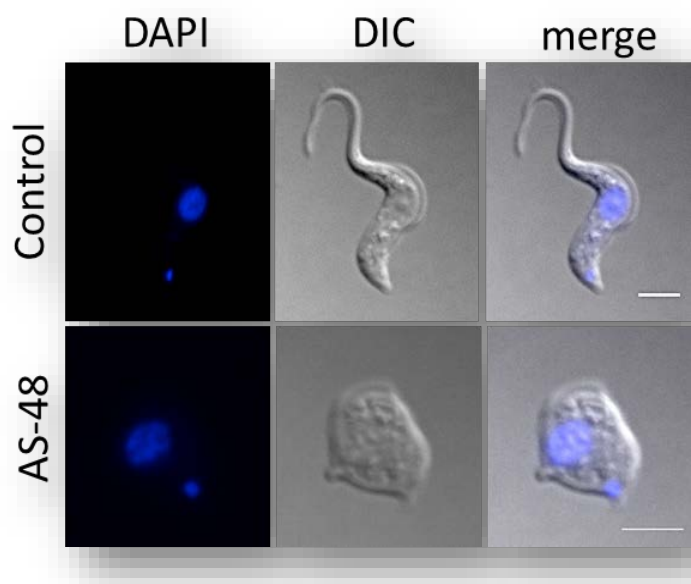
**Figura 63. AS-48 inhibe la proliferación de *T. brucei*.** Se incubaron *T. brucei* PCF, BSF y células humanas MRC-5 como control con concentraciones crecientes de AS-48 a 37°C y durante 72 h. La viabilidad celular se determinó usando AlamarBlue y se expresó en porcentaje en base a las muestras control no tratadas. Los resultados muestran la media ±SD de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

EC<sub>50</sub> (nM)

BSF			PCF	Células
<i>T.brucei rhodesiense</i>	<i>T.brucei gambiense</i>	<i>T.brucei brucei</i>	<i>T.brucei brucei</i>	MRC-5
1,7 ± 0,2	2,6 ± 0,1	3,1 ± 0.2	140,0 ± 57.0	A 12.500 no se había inhibición del crecimiento

**Tabla 15. Actividad AS-48 en las subespecies de *T. brucei* causantes de HAT y nagana.** Los resultados son la media ± SD de tres experimentos independientes realizados por triplicado. EC<sub>50</sub>: concentración inhibitoria del 50% de AS-48.

El efecto de AS-48 en las formas sanguíneas se produjo tras un corto período de incubación, tanto en presencia como en ausencia de hiFBS (datos no mostrados), lo que sugiere un efecto tripanocida en los parásitos. Esta característica proporciona una ventaja adicional a AS-48, ya que los fármacos tripanocidas de acción rápida que pueden eliminar al parásito en las menores dosis posibles, son preferibles frente a los compuestos citostáticos<sup>285</sup>.



**Figura 64. Efecto citocida de AS-48 en BSF de *T. brucei*.** BSF de *T. brucei* se incubaron con 100 nM AS-48 durante 60 min a 37°C y las células se fijaron y tiñeron con DAPI (panel izquierdo). El panel del medio corresponde a las imágenes de Nomarsky (DIC) y el panel derecho muestra las imágenes una vez fusionadas. Barra de escala: 2 µm.



## 2. AS-48 tiene un efecto tripanocida independiente de su capacidad de formar poros en la membrana plasmática del parásito

De acuerdo al modo de acción bactericida descrito para AS-48, en el que su diana principal es la membrana plasmática bacteriana<sup>225</sup>, quisimos conocer si el efecto de AS-48 sobre los tripanosomas podría ser el resultado de la unión del péptido a la superficie del parásito y la posterior formación de poros en la membrana plasmática.

Para analizar esta hipótesis, estudiamos la integridad de la membrana plasmática del parásito en presencia de AS-48 mediante citometría de flujo, utilizando el marcador vital SYTOX Green. Esta sonda es incapaz de atravesar la membrana plasmática de los parásitos intactos; sin embargo, cuando presentan daños estructurales suficientes, penetra al interior de los parásitos permeabilizados uniéndose a los ácidos nucleicos y volviéndose fluorescente. Así, los parásitos se trataron con diferentes concentraciones de AS-48 (50, 100 y 500 nM) durante 10, 30 y 60 min a 37°C (tabla 16), y se midió su fluorescencia intracelular mediante citometría de flujo<sup>242</sup> y su viabilidad mediante observación al microscopio óptico<sup>286</sup>.

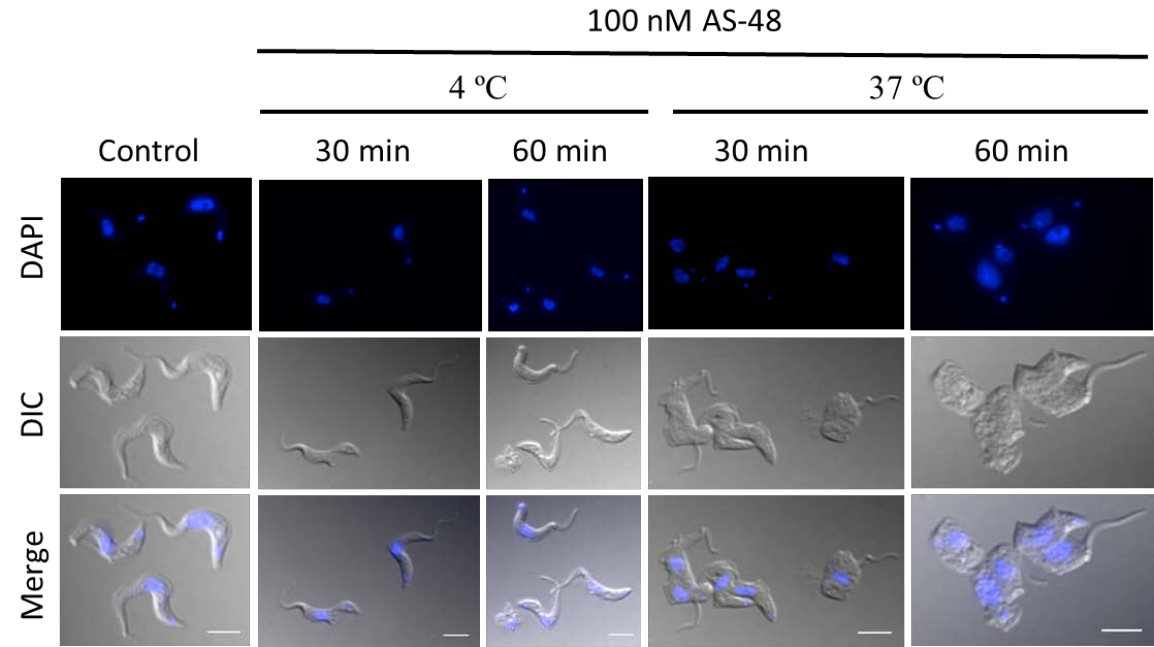
Time (min)	AS-48 (μM)	4 °C		37 °C	
		Intracellular Fluorescence (% control)	Death (%)	Intracellular fluorescence (% of control)	Death (%)
10	0.05	< 2	< 10	< 2	12 ± 3.4
30		< 2	< 10	< 2	26.2 ± 20.8
60		< 2	< 10	< 2	34.6 ± 4.8
10	0.01	< 2	< 10	< 2	9.4 ± 3.4
30		< 2	< 10	< 2	37.6 ± 26.0
60		< 2	< 10	< 2	63.4 ± 12.5
10	0.5	< 2	< 10	< 2	26.6 ± 13.9
30		< 2	< 10	3.3 ± 3.1	86.0 ± 12.4
60		< 2	< 10	7.1 ± 0.5	95.5 ± 2.5

**Tabla 16. Las concentraciones tripanocidas de AS-48 no permeabilizan la membrana plasmática del parásito.** El efecto de AS-48 en la permeabilidad de la membrana plasmática se determinó mediante citometría de flujo utilizando SYTOX® Green como se describe en el apartado 23.2 de materiales y métodos. Como control de permeabilización se usó 0.1 % de Tritón™ X-100.



Como se muestra en la tabla 16 y figura 65, aunque el tratamiento con 100 nM de AS-48 resultó significativamente tripanocida a 37°C (con un porcentaje de muerte celular de aproximadamente 40-60% a los 30-60 min), la acumulación de SYTOX® Green sólo aumentó ligeramente (<2%) en comparación con el control de permeabilización máxima de las células, que se obtuvo tratando los parásitos con 0.1% del detergente Tritón™ X-100.

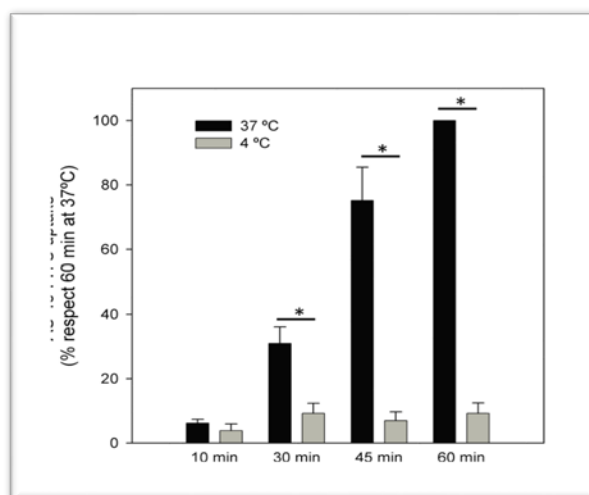
Además, este efecto tripanocida fue dependiente de temperatura, ya que a 4°C el tratamiento con concentraciones y tiempos más elevados (incluso a 500 nM y 60 min), no resultaron dañinos para los parásitos.



**Figura 65. Control de la muerte celular mediante microscopía.** La muerte del parásito bajo las mismas condiciones utilizadas en la tabla 16, se controló usando microscopía óptica para calcular el porcentaje de parásitos no móviles.

### 3. Papel de la endocitosis mediada por clatrina en la internalización de AS-48

Como la endocitosis en *T. brucei* se bloquea a 4°C<sup>287</sup>, la ausencia de un efecto tripanocida a esta temperatura podría sugerir que AS-48 necesita internalizarse para ejercer su actividad, un requisito ya propuesto para explicar el efecto tripanocida de los neuropéptidos<sup>212</sup>. Para explorar la relación entre la endocitosis y la actividad de AS-48, primero estudiamos la entrada de AS-48 unido al fluoróforo FITC en las formas sanguíneas de *T. brucei*. Tras validar que AS-48-FITC tenía la misma capacidad tripanocida que la bacteriocina sin marcar (dato no mostrado), los parásitos se incubaron con 0,2 µM de AS-48-FITC durante 10, 30, 45 y 60 minutos a temperatura fisiológica (37°C) y también a 4°C (temperatura a la que se inhibe la endocitosis). Los resultados (figura 66) muestran claramente que mientras la acumulación de AS-48-FITC aumentaba con el tiempo a 37°C, el péptido no se internalizaba a 4°C. La acumulación intracelular de AS-48-FITC a 37°C podría ser incluso mayor que la mostrada en la figura 64, ya que la fluorescencia de FITC podría verse disminuida en los compartimentos ácidos de la ruta endocítica<sup>288</sup>. Desafortunadamente, debido a su alta actividad tripanocida y a la baja sensibilidad del marcaje FITC, no fue posible analizar la localización intracelular de AS-48 por microscopía de fluorescencia.

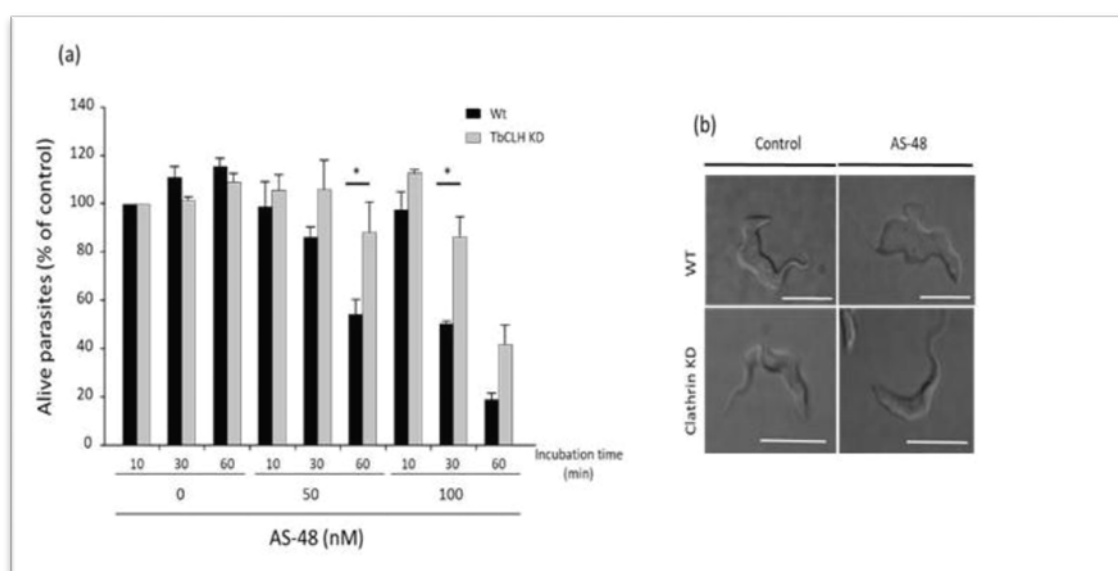


**Figura 66. La entrada de AS-48-FITC por *T. Brucei* BSF depende de la temperatura.** BSF Incubados a 4°C o 37°C con 0,2 µM de AS-48-FITC durante 10, 30, 45 y 60 min. La acumulación de AS-48 se analizó mediante citometría de flujo. Los resultados son la media ±SD de tres experimentos. Las diferencias significativas se determinaron usando la prueba t de Student (\*, p <0.05 versus 4°C).



Este resultado sugería que la endocitosis jugaba en efecto un papel esencial en la captación de AS-48, y que la internalización de la bacteriocina era necesaria para que ésta se volviese tripanocidamente activa.

Para determinar definitivamente el papel de la endocitosis en la acción tripanocida de AS-48, decidimos inhibir específicamente este proceso reduciendo la expresión de clatrina (TbCLH) a través de la interferencia de ARN (ARNi), ya que en *T. brucei*, la endocitosis es un mecanismo exclusivamente dependiente de clatrina<sup>231</sup>. Tras confirmar que la entrada de transferrina humana por endocitosis se disminuía en un 59% tras 4h de inducción del ARNi sin afectar al crecimiento celular (dato no mostrado), los parásitos knockdown (KD) para TbCLH se incubaron con 50 o 100 nM de AS-48 y la supervivencia celular se evaluó a los 10, 30 y 60 min.



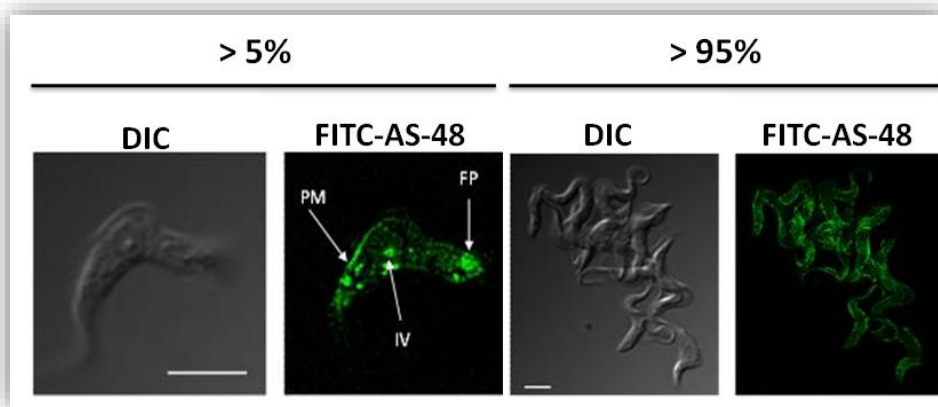
**Figura 67. AS-48 es internalizado por *T. brucei* BSF a través de endocitosis dependiente de clatrina.** (a) Las células agotadas de clatrina se incubaron con 0 (control), 0,05, 0,1 y 0,5  $\mu$ M de AS-48 durante 10, 30 y 60 min. Se contabilizó el número de células vivas. Los datos se representan como porcentajes de supervivencia celular con respecto al control (células incubadas durante 10 minutos en ausencia de AS-48). Los experimentos se realizaron por triplicado después de 4 h de inducción de TbCLH RNAi. Los resultados se muestran como la media  $\pm$ SD de tres experimentos (\*,  $p < 0,05$  frente a controles no agotados). (b) Imágenes DIC representativas de *T. b. brucei* WT vs. TbCLT KD, con (derecha) o sin (izquierda) AS-48.

Como puede observarse en la figura 67, se produjo un aumento estadísticamente significativo en la supervivencia celular (90% frente a 55%) para las células TbCLH KD después de 30 y 60 minutos de incubación con 100 nM y 50 nM de AS-48, respectivamente. Estos resultados evidencian que las células depletadas de clatrina son menos permisivas a la acción de AS-48, y, por lo tanto, demuestran que la endocitosis mediada por clatrina está involucrada en el mecanismo de acción tripanocida de AS-48.

#### 4. AS-48 interacciona con VSG en la superficie del parásito

Aunque no habíamos determinado el tipo de endocitosis responsable de la captación de la bacteriocina catiónica AS-48, era tentador pensar que ésta podría tener lugar una vez que la bacteriocina hubiese interactuado con los residuos aniónicos de la superficie externa del parásito<sup>289</sup>, tal y como se sugiere en<sup>290</sup> para el neuropéptido VIP, otro péptido tripanocida catiónico que podría unirse a glicoproteínas cargadas negativamente tales como VSG.

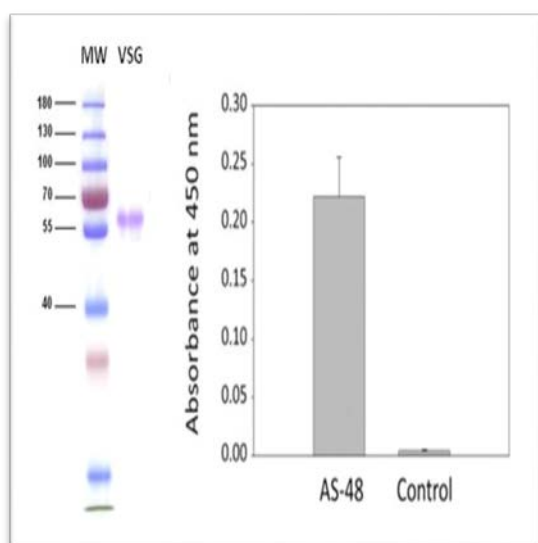
Para explorar esta posibilidad, en primer lugar, analizamos si AS-48-FITC era capaz de interactuar con la superficie de los parásitos. Para ello, se añadió una elevada concentración del péptido marcado (1  $\mu$ M) a los parásitos e inmediatamente se fijaron para evitar su efecto tripanocida.



**Figura 68. AS-48-FITC se une a la superficie de *T. brucei* BSF.** Se añadió 1  $\mu$ M de AS-48-FITC a parásitos BSF y las células se fijaron inmediatamente antes de observarse mediante microscopía de fluorescencia. Menos del 5% de las células mostraron un marcaje del bolsillo flagelar (FP) y de vesículas intracelulares (IV), sin embargo, una imagen representativa muestra cómo AS-48-FITC marca la membrana plasmática (PM) en la mayoría de las células.

Como muestra la figura 68, AS-48-FITC se localizó principalmente en la membrana plasmática de la mayoría de las células, evidenciando una interacción directa con la superficie del parásito. En estas condiciones, en menos del 5% de las células podemos observar un marcaje del bolsillo flagelar y de vesículas intracelulares, probablemente correspondientes a la vía endocítica. Sin embargo, esta localización también podría ser un artefacto debido a la alta concentración de AS-48 utilizada (más de 300 veces la  $EC_{50}$ ), que podría haber permeabilizado algunos parásitos

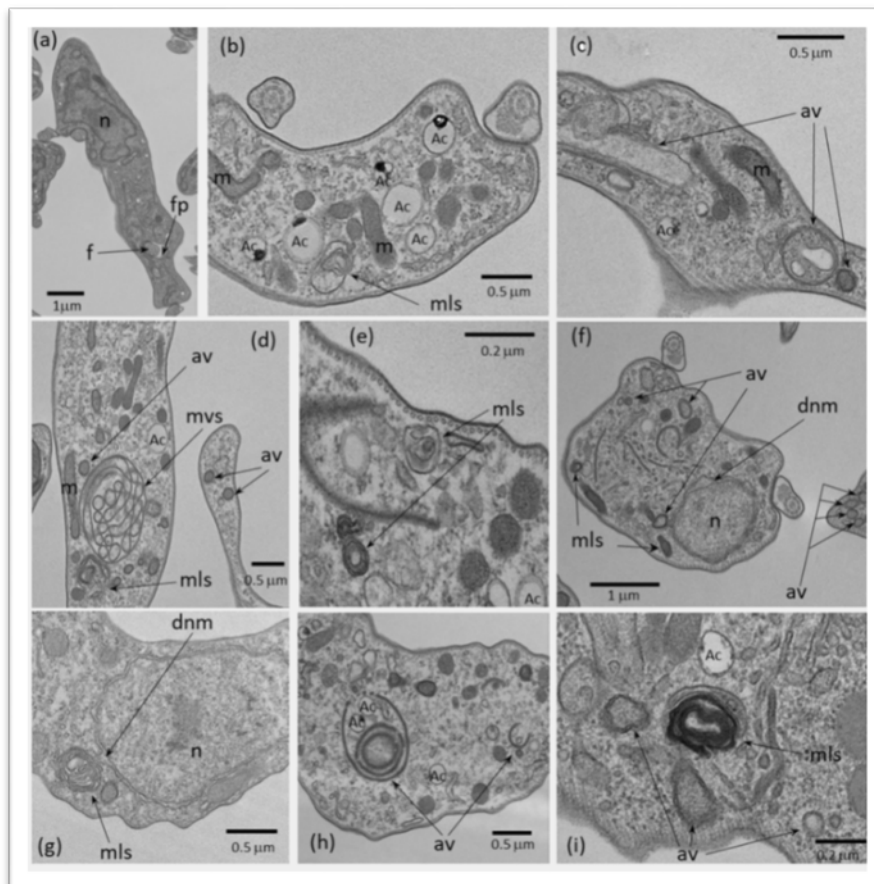
Posteriormente, monitorizamos la capacidad de AS-48 de interaccionar con la VSG purificada, usando un ensayo de interacción de tipo Elisa. Para ello, en primer lugar, se purificó VSG de la línea *T. b. brucei* Lister 427, antigenic tipo MiTat 1.2, clon 221a (figura 69). Después se fijó la VSG a una placa de ELISA mediante adsorción y seguidamente se añadió AS-48 (excepto en los pocillos de control), como se describe en el apartado 24.2 de materiales y métodos. Tras lavar la placa para eliminar el péptido libre, éste se detectó usando anticuerpos policlonales frente a AS-48<sup>244</sup> y un anticuerpo secundario unido a HRP, que produce una señal de absorción detectable en presencia de un sustrato de HRP. La figura 67 muestra la absorbancia significativa detectada a 450 nm únicamente cuando se agregó AS-48 a los pocillos que contenían VSG, lo que indica una interacción específica entre VSG y la bacteriocina.



**Figura 69. AS-48 interactúa con VSG purificada.** Izda) Purificación de VSG mediante SDS-PAGE.; Dcha) La placa ELISA de 96 pocillos recubierta con VSG purificada se incubó con AS-48 o PBS (control), y el péptido unido a VSG se detectó con anti-AS-48 (conejo), anticuerpos IgG anti-conejo conjugados con HRP y el HRP sustrato ABTS. Los resultados de la absorbancia a 450 nm son la media  $\pm$  SD de dos experimentos independientes realizados por triplicado. Las diferencias significativas se determinaron usando la prueba t de Student ( $p < 10^{-5}$  versus control).

## 5. AS-48 mata a *Trypanosoma brucei* induciendo autofagia

Como ya hemos visto, una vez que AS-48 se une a la superficie del parásito, se internaliza y posteriormente interactúa con componentes intracelulares desencadenando la muerte del parásito. Para explorar más a fondo sus efectos intracelulares, analizamos los parásitos tratados con AS-48 mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM), lo que permitió visualizar profundas alteraciones ultraestructurales en los parásitos tratados con la bacteriocina (figura 70).



**Figura 70. Alteraciones ultraestructurales en las células BSF causadas por AS-48.**

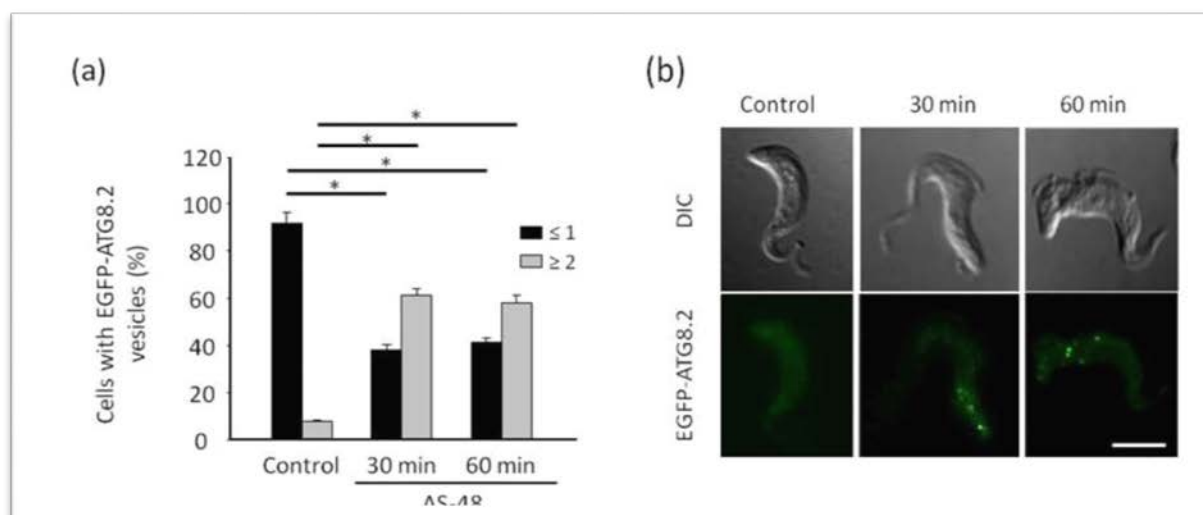
Microfotografías de transmisión representativas de secciones de resina ultrafina de parásitos BSF antes (a) o después (b-i) del tratamiento con 100 nM de AS-48 durante 60 min. Se observan características morfológicas de unamuerte celular autofágica. Las vacuolas de tipo autofágico (av), las estructuras de tipo mielina (mls), las estructuras multivesiculares (mvs) y la membrana nuclear dilatada (dnm) se muestran con flechas negras. f, flagelo; fp, bolsillo flagelar; m, mitocondria; n, núcleo; Ac, acidocalcisome. Las barras de escala están indicadas en las imágenes.

La incubación con 100 nM de AS-48 durante 60 min no afectó la integridad de la membrana plasmática sino que indujo un aumento en el número de estructuras vesiculares dentro del citosol, incluida la presencia de vesículas de doble membrana que se asemejan a vacuolas autofágicas (figura 70, micrografías c, f, h, i), estructuras similares a la mielina (figura 70, micrografías b, d, g,i), estructuras multivesiculares (figura 70, micrografía d) e incluso alteraciones de la envoltura nuclear con regiones de la membrana nuclear externa separadas de la membrana nuclear interna (figura 70, micrografías f, g).

Para confirmar definitivamente el papel de la autofagia en el mecanismo de muerte celular inducida en los parásitos tratados con AS-48, se monitorizó la formación de autofagosomas que contenían ATG8.2 en parásitos tratados con AS-48. ATG8.2 es una proteína de tipo ubiquitina que se requiere para la formación de la membrana del autofagosoma. En condiciones normales se encuentra en estado soluble, en el citosol celular. Sin embargo, en condiciones que favorecen la autofagia, la proteína es reclutada en la membrana de los autofagosomas, que pueden monitorizarse mediante microscopía de fluorescencia cuando se usa una quimera de ATG8.2 fusionada a una sonda fluorescente<sup>291</sup>.

Así pues, en primer lugar, clonamos ATG8.2 con la proteína fluorescente EGFP en el extremo amino terminal. A continuación, las formas sanguíneas de *T. b. brucei* se transfectaron con EGFP-ATG8.2 y una vez seleccionadas, se incubaron con 100 nM de AS-48 durante 30 y 60 min. El número de autofagosomas marcados por célula se cuantificó mediante microscopía de fluorescencia tras analizar más de 200 células. En la mayoría de las células control (99.5%), EGFP-ATG8.2 se distribuyó principalmente en el citoplasma (63%) o se visualizó como una única estructura punteada (36%), mientras que casi ningún parásito (0.5%) contenía más de un autofagosoma (figura 71). En contraste, los parásitos tratados con AS-48 mostraron un aumento significativo en el número de autofagosomas por célula. Alrededor del 60% de los parásitos contenían dos o más autofagosomas, mientras que sólo una minoría de células no presentó estructuras punteadas (15%) (figura 69). De hecho, el número promedio de autofagosomas por célula aumentó más de 5 veces (de 0,38 a 2,01) tras el tratamiento con AS-48.





**Figura 71. AS-48 aumenta la cantidad de autofagosomas en BSF de *T. brucei*.** a) Los parásitos transfectados con EGFP-ATG8.2 se incubaron en presencia de 100 nM AS-48 durante 0, 30 y 60 minutos a 37°C. Luego se fijaron y la autofagia se monitorizó contando el número de autofagosomas marcados con EGFP-ATG8.2 por célula. Se representó como el porcentaje de células que contenían más o menos de un autofagosoma para cada condición. Los resultados son la media  $\pm$  SD de dos experimentos independientes realizados por duplicado. Las diferencias significativas se determinaron usando la prueba t de Student (\*,  $p < 0.05$  versus control). b) Imagen representativa que muestra los autofagosomas fluorescentes. Barra de escala: 5  $\mu$ m.



## Discusión

---

Las bacteriocinas son péptidos/proteínas de síntesis ribosómica secretados por bacterias, con diferentes mecanismos de acción bactericida, tamaño, y propiedades bioquímicas. Este grupo de sustancias naturales posee notables propiedades biotecnológicas: baja toxicidad, actividad en amplios intervalos de pH, y falta de resistencia cruzada con los antibióticos. Estos compuestos pueden complementar, o en su caso, sustituir a los antibióticos y quimioterápicos. De hecho, las bacteriocinas están siendo re-descubiertas por su potencial en clínica y veterinaria, habiéndose empleado con éxito en el control de bacterias, virus y hongos<sup>292,293</sup>. Sin embargo, muy poco se ha investigado acerca de su acción frente a parásitos tripanosomátidos responsables de enfermedades tropicales, hoy día desatendidas a pesar de ser emergentes.

El complejo *Trypanosoma brucei* está formado por protozoos hemoflagelados que infectan a vectores artrópodos (mosca tse-tse, género *Glossina*) y a mamíferos y son causa de la enfermedad del sueño o tripanosomiasis humana africana y del nagana, enfermedad que afecta al ganado, considerada una de las principales causas de la pobreza en África. Los tratamientos actuales distan mucho de ser idóneos por carecer de vacunas y de tratamientos profilácticos, y por la dificultad añadida de las variaciones antigénicas del parásito<sup>294</sup>.

En la actualidad hay pocos fármacos disponibles, algunos tóxicos y otros ya sin efectividad por las resistencias desarrolladas. Además, para la fase neurológica de la enfermedad sólo se dispone de melarsoprol, extremadamente tóxico (2-12% de muerte)<sup>295</sup>. Urge, por lo tanto, encontrar nuevos compuestos tripanocidas.

El presente estudio demuestra la eficacia de AS-48 frente al complejo *T. brucei*, sugiriendo que esta bacteriocina podría ser un prometedor fármaco dirigido para el tratamiento de estas patologías. La bacteriocina exhibió una elevada capacidad tripanocida inhibiendo la proliferación *in vitro* de las formas sanguíneas de *T. brucei* a concentraciones de rango nanomolar (figura 63 y tabla 15), con una EC<sub>50</sub> entre 1,70 y 3,12 nM *T. brucei rhodesiense*, *T. brucei gambiense* y *T. brucei brucei*.

Por el contrario, no observamos ningún efecto citotóxico en células MRC-5, utilizadas como control de la toxicidad del fármaco<sup>296-298</sup> a 12,5  $\mu\text{M}$  de AS-48, la mayor concentración probada. Igualmente, en células Raw 264,7 provenientes de una línea celular monocítica murina, se ha descrito que a 50  $\mu\text{M}$  de AS-48 sólo hay un 22% de inhibición del crecimiento<sup>229</sup>. El índice de selectividad de AS-48 fue por lo tanto 30.000 veces mayor.

Estos valores de  $\text{EC}_{50}$  en tripanosomas sanguíneos fueron más bajos que los descritos para agentes tripanocidas actualmente en uso, como la suramina, la pentamidina o el melarsoprol<sup>299</sup>. De hecho, el efecto tripanocida de AS-48 fue más fuerte que el efecto-cidal descrito frente a bacterias, siendo las más susceptible *Listeria monocytogenes* (140 nM)<sup>300</sup> y *Enterococcus* (500 nM)<sup>227</sup>.

En general, las  $\text{EC}_{50}$  frente a *T. brucei* fueron varios órdenes de magnitud menores que las descritas para la mayoría de los AMPs activos frente a estos parásitos, como pleurocidina (3,7  $\mu\text{M}$ ), CP-26 (1,7  $\mu\text{M}$ ), atacina (0,3  $\mu\text{M}$ ), stomoxyn (37  $\mu\text{M}$ ), indolicina (5,2  $\mu\text{M}$ ) o algunos compuestos antimicrobianos humanos como el neuropéptido VIP (2,8  $\mu\text{M}$ ), adrenomedulina (1,8  $\mu\text{M}$ ) o LL-37 (1,7  $\mu\text{M}$ )<sup>301</sup>. Estos valores de  $\text{EC}_{50}$  fueron e incluso menores que los descritos para los péptidos leucinostatina A y B (6-7 nM), que por otra parte son más efectivos frente a *T. b. brucei* que frente a *T. b. rhodesiense* y presentan índices de selectividad 80 veces más bajos que los vistos en AS-48<sup>301,302</sup>. Además, la acción de AS-48 sobre los parásitos se produjo tras un corto período de incubación, lo que sugiere un efecto tripanocida y esta característica, sin duda, supondría una ventaja adicional ya que los fármacos tripanocidas de acción rápida son preferibles a los compuestos citostáticos<sup>285</sup>.

De manera interesante, AS-48 también fue activa frente a las formas procíclicas de *T. b. brucei*. Aunque esta  $\text{EC}_{50}$  es 45 veces más alta que la de BSF, es mucho más baja que las informadas para otros AMPs, que generalmente no presentan ninguna actividad o la actividad se encuentra en un rango micromolar alto<sup>301</sup>, siendo la atacina la excepción<sup>303</sup>.

Numerosos estudios han demostrado que AS-48 no tiene actividad frente a la mayoría de las células eucariotas probadas, incluyendo levaduras y parásitos como *Naegleria fowleri* o *Acanthamoeba spp.*<sup>227,304</sup>. Sin embargo, recientemente ha sido



publicada la letalidad de AS-48 frente a formas promastigotes y amastigotes intracelulares de *Leishmania spp.*, con una escasa citotoxicidad en macrófagos<sup>229</sup>.

La amplia actividad antimicrobiana de AS-48 se explica por su naturaleza anfipática y la estructura cíclica que posee debido al enlace peptídico que se forma entre los extremos de la molécula durante el proceso de maduración. Ello le confiere una considerable estabilidad en amplios intervalos de pH, temperatura y también durante el almacenamiento, características que son de un valor inestimable para el desarrollo y la posible administración de esta molécula. AS-48 posee un marcado carácter catiónico por su elevado porcentaje en residuos básicos localizados en un dominio de la molécula, y la tendencia confirmada a adoptar estructuras anfipáticas cuando se encuentra en contacto con las membranas fuertemente cargadas<sup>227</sup>.

Según el modo de acción bactericida descrito para AS-48, en el que su diana primaria es la membrana bacteriana<sup>225</sup>, en nuestra primera hipótesis nos planteamos que el efecto de la bacteriocina sobre el tripanosoma podría ser el resultado de la unión del péptido con la membrana plasmática del parásito y la posterior formación de poros. Sin embargo, nuestros resultados usando la sonda vital SYTOX® Green indicaron que AS-48 no mata al parásito permeabilizando su membrana y, por lo tanto, no promueve la rápida entrada y salida de pequeñas moléculas, como ocurre en bacterias e incluso en *Leishmania*<sup>228,229</sup>. Es por ello que AS-48 debe provocar un mecanismo de muerte celular diferente al previamente caracterizado en otros tipos celulares, donde provoca la pérdida de iones a través de los poros formados por AS-48 en la membrana.

Como estos estudios también indicaron que el efecto tripanocida de AS-48 dependía de la temperatura, perdiendo completamente su eficacia a 4°C, y la endocitosis de *T. brucei* se bloquea a esta baja temperatura<sup>287</sup>, la ausencia de un efecto tripanocida en frío podría sugerir que AS-48 necesita endocitarse para ejercer su actividad, un requisito ya propuesto para neuropéptidos<sup>212</sup>.

Aunque la endocitosis de *T. brucei* se limita al bolsillo flagelar, una pequeña invaginación específica de la membrana plasmática que rodea la base del flagelo, este proceso es extremadamente eficiente en las formas sanguíneas de los parásitos<sup>231,305</sup>.

Los estudios de captación de AS-48 marcado con FITC a distintas temperaturas, que mostraron la ausencia de internalización del péptido en frío, sugirieron que, efectivamente, la endocitosis juega un papel esencial en la captación de AS-48. El requerimiento de clatrina para que AS-48 ejerza su efecto tripanocida demostró de manera definitiva que la endocitosis mediada por clatrina está involucrada en la internalización de AS-48 y es necesaria para su efecto tripanocida. Esta dependencia de la endocitosis podría además explicar la mayor actividad de AS-48 en BSF en comparación con PCF o *Leishmania*, ya que estos últimos tienen una menor tasa de endocitosis<sup>306,307</sup>. Por otra parte, este modo de acción dirigido al interior del tripanosoma se considera una estrategia atractiva en el desarrollo de nuevos fármacos<sup>308,309</sup>. De hecho, la endocitosis también media la captación del tripanocida natural ApoL1<sup>108</sup> y de fármacos como la suramina<sup>310</sup> al interior del parásito.

La captación de AS-48 podría ser por endocitosis en fase fluida o mediada por la interacción con algún ligando. Nos planteamos que, debido a su naturaleza catiónica, AS-48 pudiera unirse a la capa ligeramente aniónica de VSG, presente en la superficie del parásito<sup>289</sup> y fuese internalizado rápidamente como se sugiere para el neuropéptido VIP, otro péptido tripanocida catiónico que se cree que se une a las glicoproteínas cargadas negativamente<sup>290</sup>.

Esta hipótesis fue comprobada ya que, por una parte, AS-48-FITC interactuaba con la superficie de los parásitos y, por otra, AS-48 era capaz de interactuar con VSG purificada, como demostraron los ensayos de ELISA. Estos resultados sugieren claramente que AS-48 es endocitado tras su interacción con la VSG. El elevado número de copias de esta glicoproteína en la superficie parasitaria ( $10^7$  moléculas por célula) y su extremadamente rápida internalización y reciclado por endocitosis (la capa de VSG es completamente internalizada en 12,5 min)<sup>311</sup>, podría explicar la eficiencia y especificidad de AS-48 frente a *T. brucei* BSF.

Este mecanismo podría además ayudar a prevenir el desarrollo de resistencias mediante la reducción en la captación de AS-48<sup>308</sup> ya que la endocitosis es esencial para el parásito<sup>305</sup> y, posiblemente, también explique nuestra incapacidad para generar parásitos resistentes a AS-48.



Finalmente, el análisis por microscopía electrónica de los efectos intracelulares de los parásitos tratados con AS-48 nos dio una idea acerca del mecanismo de muerte celular provocado por AS-48, una vez internalizado. Las profundas alteraciones ultraestructurales observadas en los parásitos tratados que incluían una amplia variedad y elevada frecuencia de estructuras vesiculares de tipo autofágico, indicaron que las células tratadas probablemente mueren por autofagia. De hecho, se observaron alteraciones ultraestructurales similares a las descritas tras el tratamiento de los parásitos con compuestos que inducen la muerte celular autofágica en *T. brucei* (a concentraciones mucho más altas) como es el caso de la dihidroxiacetona (DHA) (a 3 mM)<sup>312</sup> y el neuropéptido VIP (a 40 µM)<sup>290</sup>. Además, la monitorización de la formación de autofagosomas que contienen ATG8.2, nos permitió confirmar definitivamente el papel de la autofagia en el mecanismo de muerte celular inducida por AS-48.

De manera interesante, este mecanismo de acción de AS-48 en *T. brucei* es diferente del recientemente publicado para explicar el efecto leishmanicida de la bacteriocina<sup>229</sup>. En *Leishmania*, AS-48 produce una permeabilización parcial de la membrana plasmática, con colapso del potencial de la misma, y una disfunción mitocondrial, que conlleva una disminución de los niveles de ATP intracelular y de la velocidad de consumo de oxígeno. Estos procesos finalmente conducen a una muerte celular apoptótica. Sin embargo, en *T. brucei*, AS-48 no forma poros en la membrana plasmática, sino que es internalizado mediante endocitosis mediada por clatrina tras su interacción con las VSG de la superficie del parásito, generando los fagosomas que contienen AS-48. La bacteriocina podría alterar la estructura de estas vesículas membranosas de la vía endocítica, ya que AS-48 es un péptido capaz de interaccionar con membranas que, una vez que se acumula en las mismas, cambia a una configuración dimérica diferente (de DF-I a DF-II) que produce poros en la membrana<sup>225,313</sup>. De hecho, resultados preliminares muestran que un mutante de AS-48 (AS-48<sup>W24A</sup>) que presenta una notable alteración en la inserción a las membranas<sup>314</sup> presenta una actividad tripanocida más de 300 veces inferior en comparación con AS-48 salvaje. Por lo tanto, las estructuras de tipo mielina, las vacuolas autofágicas y las estructuras multivesiculares observadas después del tratamiento con AS-48 podrían desarrollarse después de que estas membranas endocíticas dañadas por AS-48 se degraden por autofagia<sup>312,315</sup>.

Esto es probablemente indicativo de una respuesta celular reparadora debido al daño celular que AS-48 causa a la estructura y la función de estas membranas, como ya se sugirió para el caso del agente tripanocida DHA<sup>312</sup>. AS-48 podría entonces conducir a un aumento exacerbado de la autofagia provocando la muerte del parásito, como también se ha propuesto en el caso de DHA<sup>312</sup>. En cualquier caso, como la relación causa-efecto de la autofagia y la muerte celular no se comprende bien en *T. brucei*, especialmente en las formas sanguíneas, no podemos descartar la posibilidad de que la inducción del proceso autofágico pueda desencadenarse como mecanismo de rescate ante la muerte celular causada por AS-48, y, por lo tanto, la autofagia en sí misma no sea la responsable de la muerte celular<sup>316</sup>.

Como conclusión, los resultados presentados en esta tesis, muestran a AS-48 como la primera bacteriocina que tiene actividad frente a *T. brucei*, matando a las formas sanguíneas de diferentes subespecies de este parásito a concentraciones más bajas que las requeridas para los fármacos actualmente utilizados para tratar la HAT, siendo inocua para las células humanas y con un mecanismo de acción diferente al bactericida y leishmanicida. Este eficaz efecto tripanocida junto a la estabilidad de esta bacteriocina, su alta resistencia a las exopeptidasas y a su muy baja inmunogenicidad, sugieren que AS-48 podría ser un atractivo nuevo compuesto líder frente a *T. brucei*.







**Evaluación de la actividad tripanocida *in vitro* de distintos compuestos de origen natural y sintético**



# La Sitamaquina y la Tafenoquina muestran actividad frente a *Trypanosoma brucei*

Los resultados del siguiente apartado forman parte de los artículos:

“The Oral Antimalarial Drug Tafenoquine Shows Activity against *Trypanosoma brucei*”.

Publicados en: Antimicrob Agents Chemother. 2015.

“Sitamaquine overcomes ABC-mediated resistance to miltefosine and antimony in

*Leishmania*”. Publicados en: Antimicrob Agents Chemother. 2011.

## Antecedentes

---

Los fármacos de reposición son aquellos medicamentos en uso para otras indicaciones terapéuticas y, por tanto, su toxicidad, farmacodinámica y farmacocinética son conocidos. La reutilización de medicamentos orales podría reducir tanto el tiempo como el costo asociados en el descubrimiento de nuevos fármacos. Un ejemplo podrían ser las 8-aminoquinolinas sitamaquina y tafenoquina.

Las 8-aminoquinolinas fueron desarrolladas inicialmente para el tratamiento de la malaria, enfermedad producida por parásitos del género *Plasmodium*. En 1920 se sintetizó la primera 8-aminoquinolina con el propósito de buscar un compuesto alternativo a la quinina para el tratamiento de la malaria<sup>317</sup>. Actualmente y tras posteriores modificaciones que dieron lugar a la primaquina, ésta sigue siendo el único fármaco antimalárico disponible en clínica que bloquea la transmisión del parásito, mostrando una marcada actividad frente a los gametocitos de todas las especies de *Plasmodium* que producen malaria humana. Además de su uso antimalárico, se ha demostrado que la primaquina es efectiva frente especies de *Leishmania* y *Trypanosoma*<sup>318</sup>.

Al objeto de mejorar el índice terapéutico de la primaquina y encontrar análogos más activos y específicos, se desarrolló la síntesis de un gran número de 8-

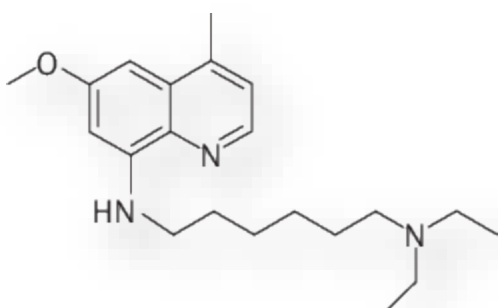


aminoquinolinas análogas de la primaquina, entre ellas la **sitamaquina** y la **tafenoquina**<sup>317</sup>.

El mecanismo de acción de las 8-aminoquinolinas como antimaláricos no está claro todavía, aunque su biotransformación parece ser necesaria tanto para su eficacia como para su toxicidad; igualmente, la generación de estrés oxidativo selectivamente en las células parasitadas es el mecanismo más probable de su eficacia y toxicidad<sup>317</sup>.

### *Sitamaquina*

La sitamaquina (SQ) fue sintetizada en 1940 con el objetivo de la búsqueda de antimaláricos. Posteriormente, en un estudio dirigido hacia la selección de



nuevos fármacos con actividad leishmanicida en un modelo de hámster en *L. donovani*, la SQ administrada de forma oral, resultó ser el compuesto candidato más prometedor para un desarrollo clínico<sup>319</sup>.

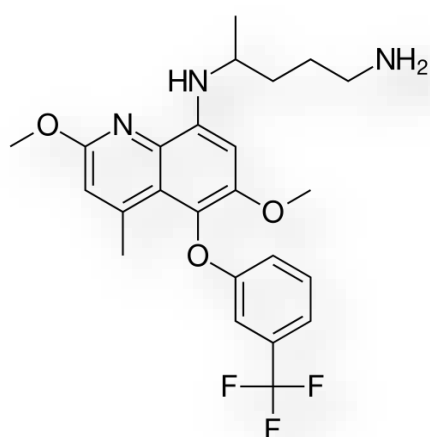
**Figura 72. Estructura de la sitamaquina**

El mecanismo de acción de las 8-aminoquinolinas frente a los protozoos, es en general, poco conocido. La entrada de la SQ al parásito, comienza con una interacción electrostática con los fosfolípidos aniónicos de la membrana plasmática. Vercesi y Docampo, observaron una despolarización de la membrana mitocondrial en promastigotes de *L. donovani* permeabilizados con digitonina, junto con la alcalinización de los acidocalcisomas, donde se acumulaba la SQ, aunque no se encontró correlación con su toxicidad<sup>320</sup>. Posteriormente, Carvalho y colaboradores, proporcionaron más información acerca del mecanismo leishmanicida de la SQ, la cual, inhibe de una manera dosis-dependiente, el complejo II (succinato deshidrogenasa) de la cadena respiratoria en promastigotes de *L. donovani* permeabilizados con digitonina. A su vez, se produce una caída del nivel de ATP intracelular y una disminución del potencial de la membrana mitocondrial; esto está asociado con un incremento en los niveles de especies reactivas de oxígeno y de  $\text{Ca}^{2+}$

libre intracelular, con un mayor porcentaje de parásitos con ADN en fase sub-G1, y con la exposición de la fosfatidilserina en la cara externa de la membrana plasmática. Por lo tanto, estos resultados en conjunto indican la actividad leishmanicida de la SQ está determinada por la inhibición del complejo II de la cadena respiratoria, lo cual desencadena un estrés oxidativo y finalmente la muerte del parásito mediante un proceso similar a la apoptosis<sup>321</sup>. Ensayos clínicos en fase IIb frente a leishmaniasis visceral mostraron resultados con distintos niveles de éxito dependiendo de las especies de *Leishmania* y de la zona donde fueron realizados. Se detectaron efectos secundarios adversos como dolor de cabeza, dolor abdominal, nefropatía y metahemoglobinemia<sup>321</sup>.

### Tafenoquina

La tafenoquina (TFQ) fue identificada en 1963 con el objetivo de descubrir fármacos antimaláricos. Inicialmente fue estudiada como un sustituto de la



primaquina para la cura radical de la malaria causada por *P. vivax*, pero luego se identificó como un fármaco antimalárico de amplio espectro con potencial para ser usado para la profilaxis frente a malaria en viajeros no inmunes y para el tratamiento de infecciones establecidas con *P. falciparum* resistentes a múltiples fármaco<sup>322</sup>.



**Figura 73. Estructura de la tafenoquina.**

Ensayos clínicos en fase II han demostrado que la tafenoquina es muy eficaz para la profilaxis frente a infecciones con *P. falciparum* y *P. vivax*. Se ha observado que la administración de cloroquina seguido de un tratamiento con tafenoquina, puede ser más efectivo para evitar las recaídas con *P. vivax* que un tratamiento de cloroquina con primaquina<sup>323</sup>. Además, de su su gran eficacia en modelos experimentales *in vitro* e *in vivo*, la tafenoquina mostró ser menos tóxica que la primaquina. Sin embargo, produce hemólisis en individuos con deficiencia en glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD)<sup>324</sup>.

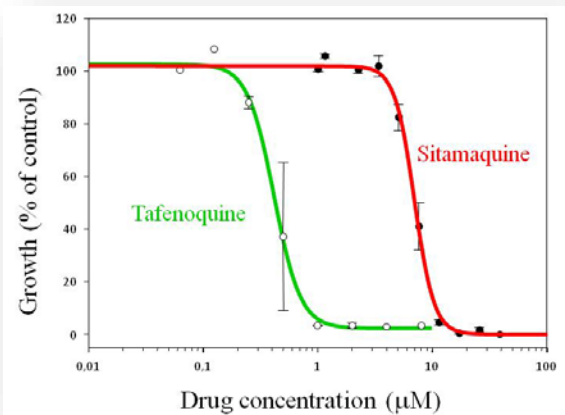
El mecanismo de acción de la tafenoquina como fármaco antimalárico no es bien conocido, aunque se ha sugerido que como sucede con otras 8-aminoquinolinas, podría producir una disfunción mitocondrial en el parásito.

Se ha demostrado que además de tener actividad como fármaco antimalárico, la tafenoquina tiene actividad *in vitro* e *in vivo* frente a distintas especies de *Leishmania*. Yardley y colaboradores, informaron que tiene actividad frente a amastigotes intracelulares de cepas de *L. donovani* provenientes de la India y África, mostrando niveles de EC<sub>50</sub> comparables con otros fármacos leishmanicidas como la miltefosina, inclusive frente a cepas resistentes a antimoniales. Por otra parte, los resultados de los estudios *in vivo* en modelos murinos demostraron un nivel de reducción de la carga parasitaria superior al 95% tanto en las cepas sensibles como en las resistentes a antimoniales<sup>325</sup>.

Estudios *in vitro* pusieron de manifiesto que al igual que sucede con la SQ, la toxicidad de la TFQ es independiente del contenido de acidocalcisomas. La TFQ afecta a metabolismo energético de los promastigotes de *Leishmania*, causando una rápida caída en el nivel de ATP intracelular sin afectar la permeabilidad de la membrana plasmática. La TFQ induce una disfunción mitocondrial a través de la inhibición de la citocromo c reductasa (complejo III de la cadena respiratoria), lo que lleva aparejado una disminución en la tasa de consumo de oxígeno y la despolarización del potencial de la membrana mitocondrial; a esto le sucede una producción de especies reactivas de oxígeno, la elevación del nivel de Ca<sup>2+</sup> libre intracelular y una posterior fragmentación del ADN. En base a estos resultados, por lo tanto, se puede concluir que la TFQ tiene como blanco de acción en *Leishmania* la mitocondria, e induce la muerte del parásito mediante un proceso similar a la apoptosis<sup>326</sup>.

# Resultados y discusión

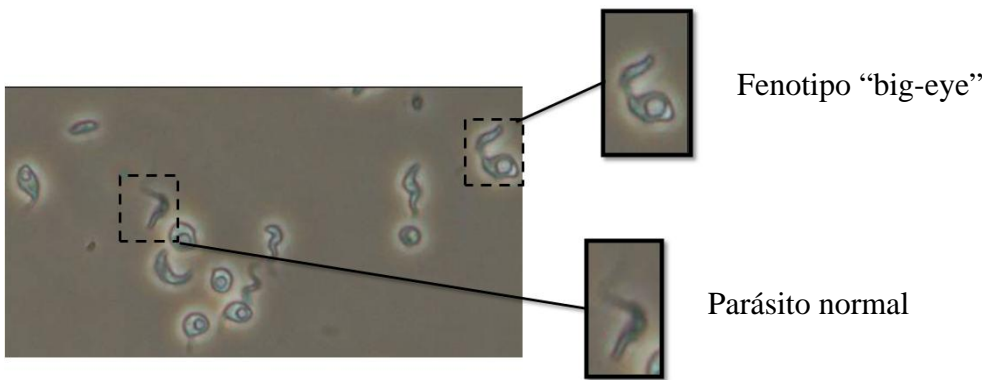
Fruto de la colaboración con la empresa GlaxoSmithKline, estudiamos la capacidad tripanocida de la sitamaquina y la tafenoquina. Ambos fármacos matan eficazmente las formas sanguíneas de *T. brucei* spp. a bajas concentraciones (figura 74). Especialmente eficaz fue la tafenoquina, que inhibió la proliferación *in vitro* de diferentes especies de *T. brucei* en concentraciones en el rango nanomolar, con EC<sub>50</sub> que van desde 0.17±0.02 µM para *T. b. rhodesiense* a 0.42±0.02 µM para *T. b. brucei*.



Fármaco	EC <sub>50</sub> (µM)
Sitamaquina	5.6 ± 1.0
Tafenoquina	0.417 ± 0.019

**Figura 74.** Ensayo de viabilidad celular frente a *Trypanosoma brucei*. Se muestran las desviaciones estándar (±SD) de tres experimentos independientes

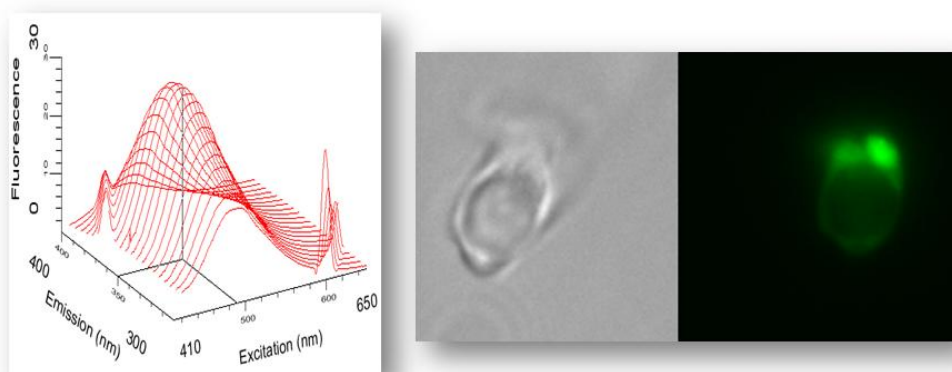
Estudios de microscopía óptica de parásitos tratados con sitamaquina, revelaron que un fenotipo de "ojo grande o bigeye".



**Figura 75.** Efecto en la morfología de parásitos BSF tratados con sitamaquina.

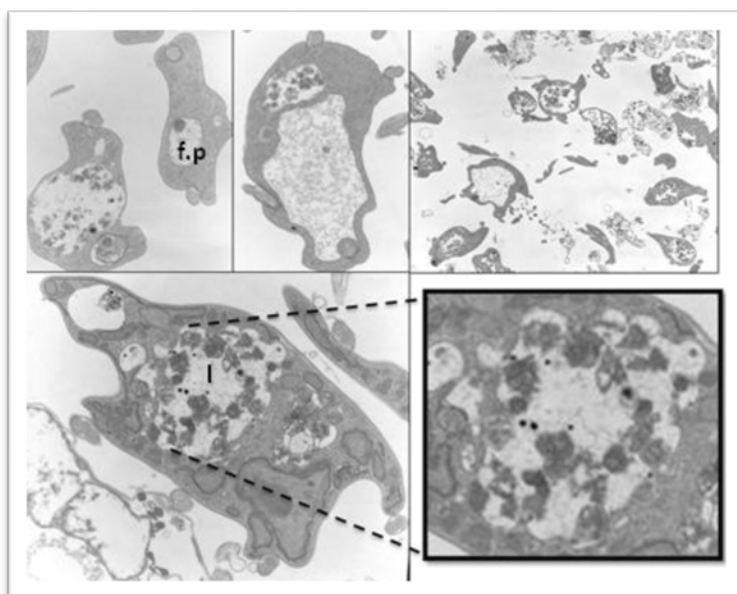


Gracias a la fluorescencia intrínseca de la sitamaquina se pudieron realizar estudios de localización del fármaco mediante microscopía de fluorescencia. Como muestra la figura 76, la sitamaquina se acumuló en un organelo intracelular aún no identificado, y estaba fuera del “big-eye”.



**Figura 76. Espectro de excitación/emisión de la sitamaquina y localización intracelular de la misma en *T. brucei*.**

Un análisis mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) de parásitos tratados con 10  $\mu$ M de sitamaquina mostró un aumento del bolsillo flagelar de los parásitos, que correspondería probablemente con el “big-eye” y del

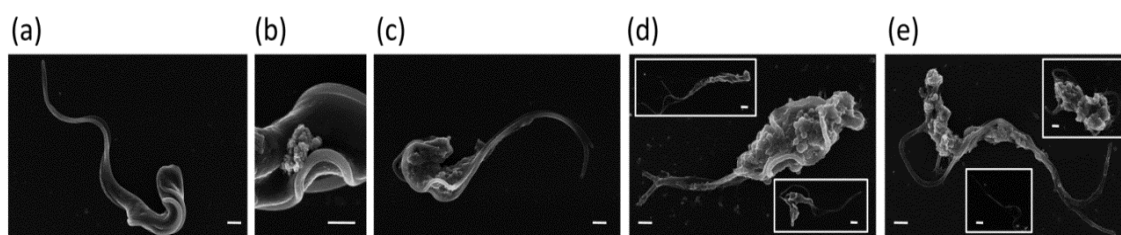


lisosoma del parásito, que podría corresponder con el orgánulo donde se acumula el fármaco, gracias a su naturaleza protonable. Otras células mostraron claros síntomas de necrosis, con ruptura de la membrana plasmática y pérdida del contenido flagelar.

**Figura 77. Efectos ultraestructurales de la sitamaquina en células BSF observadas por TEM.**



En cuanto a los parásitos tratados con tafenoquina, el estudio de las alteraciones morfológicas y los cambios ultraestructurales producidas en los parásitos se llevó a cabo mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) y de transmisión (TEM). Como puede observarse en la figura 78 (SEM), la tafenoquina produjo una desintegración de las membranas celulares con pérdida del contenido citoplásmico produciendo una muerte celular necrótica. También se observó en las células tratadas, un aumento en el número de flagelos en el parásito.

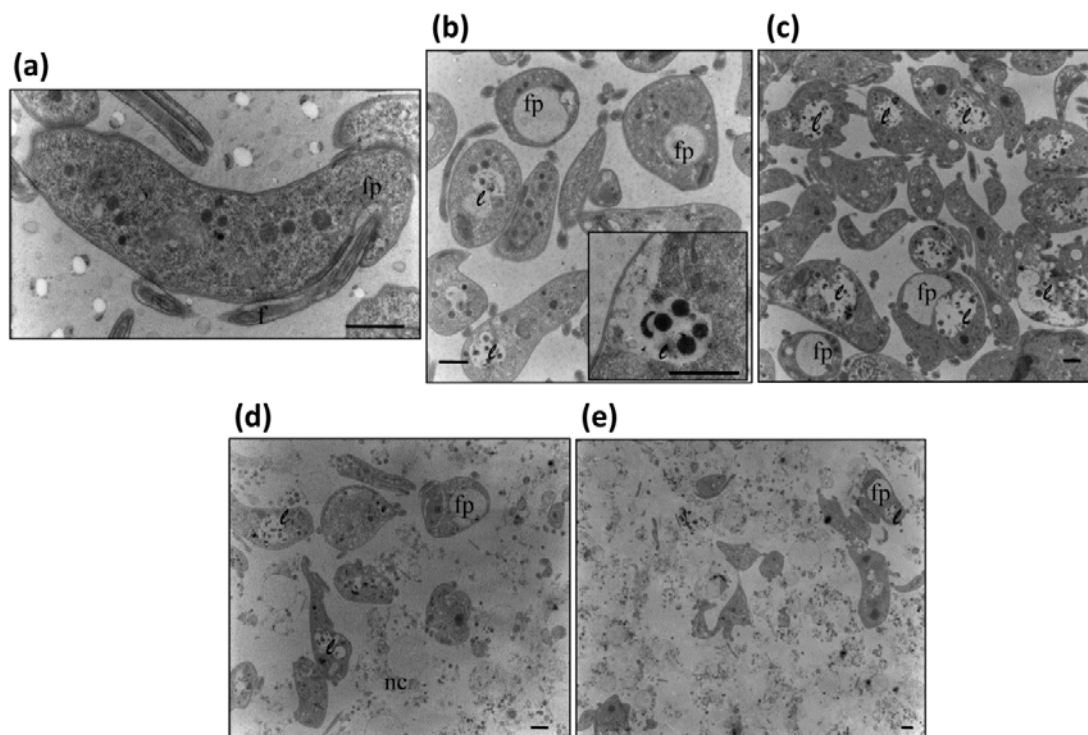


**Figura 78. Efectos de la tafenoquina sobre la morfología celular de parásitos BSF observadas por SEM.** (a) Controles. Los parásitos muestran la morfología celular normal y la integridad de la membrana. (b,c y e) Parásitos tratados con tafenoquina 1  $\mu$ M durante 3 h (b y c), 9 h (d) o 15 h (e) que muestran una superficie celular alterada y pérdida de contenido citoplásmico provocado por el fármaco. Barra de escala, 1  $\mu$ m.

Por otra parte, la microscopía electrónica de transmisión (TEM) nos reveló que la tafenoquina produjo hinchazón y lisis del lisosoma, un efecto que puede ser una causa principal de muerte celular mediada por este fármaco; los parásitos tratados con tafenoquina, además mostraron un bolsillo flagelar agrandado, probablemente correspondiente al fenotipo de "ojo grande o big-eye" observado durante la microscopía de luz de contraste de fase (datos no mostrados). Esto podría deberse a un defecto en el tráfico vesicular. El número alterado y la posición de los flagelos detectados por SEM también se observaron claramente a través de TEM. Otras alteraciones observadas incluyeron: dilatación de la envoltura nuclear, desorganización mitocondrial, lisis de vesículas internas, presencia de áreas libres de citoplasma, forma celular alterada y presencia de invaginaciones y evaginaciones de la membrana plasmática.



Finalmente, las imágenes TEM también confirmaron el proceso necrótico que incorpora la desintegración de la membrana celular y la pérdida de componentes intracelulares que condujeron a la muerte del parásito.

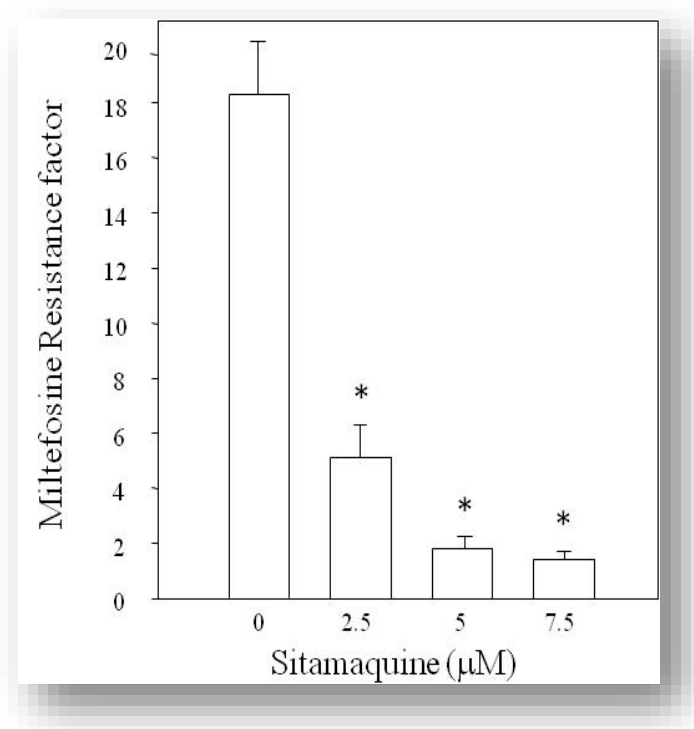


**Figura 79. Efectos ultraestructurales de la tafenoquina en células BSF observadas por TEM.**

Las células se cultivaron en ausencia (a) o presencia de TFQ 1  $\mu$ M durante 1 h (b), 3 h (c), 9 h (d) o 15 h (e). Las alteraciones ultraestructurales observadas incluyeron hinchazón y lisis de los lisosomas, dilatación del bolsillo flagelar, desintegración de la membrana celular y pérdida de contenido citoplásmico. f, flagelo; fp, bolsillo flagelar; l, lisosoma; nc, célula necrótica. Barra de escala, 1  $\mu$ m.

Estudios posteriores llevados a cabo en el laboratorio determinaron que el mecanismo de muerte inducido por la tafenoquina se basa en la acumulación del fármaco en los compartimentos ácidos, induciendo un proceso necrótico que implica la desintegración de la membrana celular y la pérdida de contenido citoplásmico, lo que lleva a la muerte del parásito. La lisis celular está precedida por una acción farmacológica amplia y con múltiples dianas, ya que afecta al lisosoma, las mitocondrias y los acidocalcisomas e induce una despolarización del potencial de membrana mitocondrial, una elevación del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y la producción de especies reactivas de oxígeno<sup>242</sup>.

Por último, añadir que la sitamaquina también mostró un interesante efecto revertidor sobre la resistencia a miltefosina mediada por la Pgp/MDR1, en una línea de *L. tropica*, probablemente debido a una inhibición de la actividad de este transportador ABC.



**Figura 80. Reversión de la resistencia a miltefosina por sitamaquina.** El crecimiento de los parásitos WT y MDR (línea que sobreexpresa el transportador Pgp/MDR1) se determinó después de la incubación durante 72 h con concentraciones crecientes de miltefosina y en presencia de las concentraciones de sitamaquina indicadas. Los datos representan los factores de resistencia ( $EC_{50}$  de miltefosina en la línea MDR en presencia o ausencia de sitamaquina versus  $EC_{50}$  en control WT) son medias  $\pm$  SD de tres experimentos independientes realizados por duplicado

Estudios posteriores llevados a cabo en el laboratorio determinaron que este efecto revertidor se debía a la inhibición del eflujo de miltefosina llevado a cabo por LMDR1. Además, también se demostró que la sitamaquina igualmente es capaz de revertir la resistencia a antimonio mediada por MRPA/LABCC3<sup>61</sup>.



# Evaluación de la actividad tripanocida de derivados de compuestos naturales

Los resultados del siguiente apartado forman parte de los artículos:

“Tyrosol and hydroxytyrosol derivatives as antitrypanosomal and antileishmanial agents”. Eur J Med Chem. 2016

“Semi-synthesis of  $\omega$ -hydroxyalkyl-carbonate derivatives of hydroxytyrosol as anti-trypanosome agents”. Submitted

## Antecedentes

---

Los productos naturales de origen vegetal, son considerados alternativas válidas sobre las drogas sintéticas convencionales. Estos compuestos naturales se han probado durante décadas para encontrar nuevos agentes leishmanicidas y tripanocidas entre ellos nos encontramos los compuestos fenólicos como los tirosoles, el resveratrol, el ácido gálico, la quercetina o la curcumina.

Los compuestos fenólicos son metabolitos esenciales para el crecimiento y reproducción de las plantas y actúan como agentes protectores frente a patógenos, siendo secretados como mecanismo de defensa a condiciones de estrés, tales como infecciones, radiaciones UV, entre otros. Juegan un rol vital en las plantas y regulan el metabolismo y síntesis de la lignina, por lo que las plantas presentan un gran número de componentes fenólicos, como flavanoles, flavonoles, chalconas, flavonas, flavanonas, isoflavonas, taninos, estilbenos, curcuminoides, ácidos fenólicos, coumarinas, lignanos, etc<sup>327</sup>.

### *Tirosol e hidroxitirosol*

Entre la extensa clasificación de compuestos fenólicos, se encuentran el tirosol (TYR) y el hidroxitirosol (HT), antioxidantes naturales presentes, en un alto porcentaje, en las aceitunas y el aceite de oliva, pudiendo aislarse además, de las aguas residuales del procesamiento de este aceite de oliva. Estos compuestos polifenólicos han atraído recientemente la atención de numerosos investigadores



debido a su amplia gama de propiedades biológicas y sus beneficios potenciales para la salud, incluidos los efectos neuroprotectores, cardioprotectores, anticancerígenos, antiinflamatorios, antioxidantes y antimicrobianos<sup>328,329</sup>.

#### *Resveratrol*

El resveratrol, es un estilbeno encontrado en las uvas, arándanos, frambuesas y moras de forma natural, que se produce de manera natural en varias plantas como respuesta a una lesión o cuando éstas se encuentran bajo el ataque de patógenos, tales como bacterias u hongos. La estructura del resveratrol se relaciona con la de las xantonas y benzofenonas, ya que tienen dos anillos aromáticos unidos por cetona, heterocíclicas o grupos vinilo. El resveratrol muestra actividad frente a diversas enfermedades crónicas, tales como inflamación, artritis, enfermedades cardiovasculares, y retrasa el envejecimiento<sup>330</sup>, mientras que las xantonas mostraron actividad antiprotzoarios incluyendo la actividad frente a *Leishmania*<sup>331</sup>.

#### *Ácido gálico*

Compuesto fenólico derivado de plantas, que puede encontrarse de forma libre o formando parte de los taninos, capaz de inducir actividades antiinflamatorias, gastroprotectoras y anticancerígenas. Estudios evaluaron las actividades leishmanicidas, citotóxicas e inmunomoduladoras del ácido gálico, demostrándose que puede inhibir el crecimiento de promastigotes de *L. major* y reducir significativamente la infección y la infectividad de macrófagos infectados por *L. major*<sup>332,333</sup>.

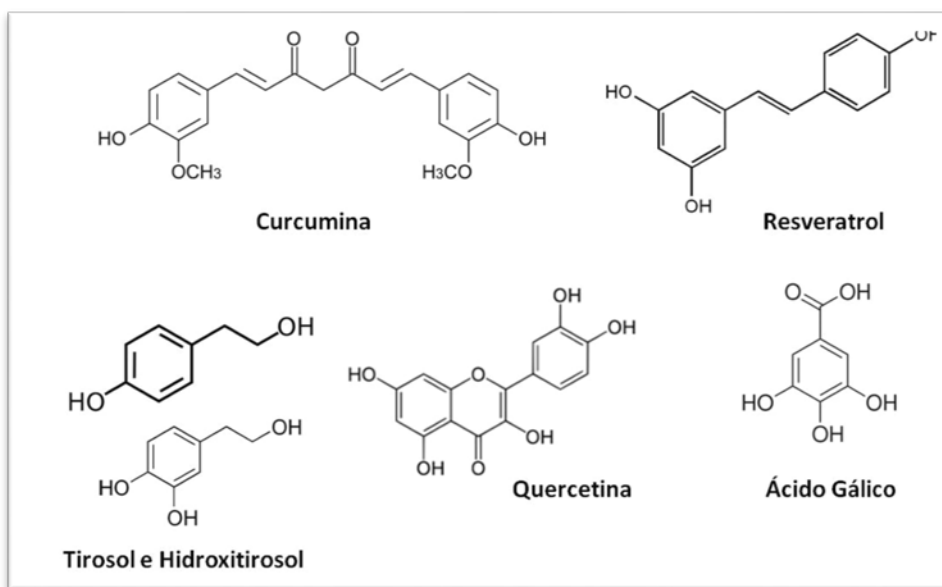
#### *Quercetina*

Flavonoide muy abundante en la dieta mediterránea, es un potente antioxidante y un buen quelante de metales. Se ha demostrado que la quercetina inhibe de manera dosis dependiente la actividad hemolítica y disminuye la secreción de alfa toxina, una proteína formadora de poros con actividad citotóxica, uno de los principales factores de virulencia secretados por la mayoría de las cepas de *Staphylococcus aureus*, en los sobrenadantes de cultivos de *S. aureus* sensible y resistente ameticilina<sup>334</sup>.

Recientemente se ha demostrado actividad antiparasitaria frente a *T. cruzi*, *L. brasiliensis* y *L. infantum* de extractos de *Psidium brownianum* y *Psidium guajava* (guayabas)<sup>332,335</sup>, indicando estas especies como una terapia alternativa dada su eficacia en los ensayos *in vitro*. Además, es capaz de revertir en *Leishmania* la resistencia a fármacos mediada por MDR1/Pgp/ABCB4<sup>336</sup>.

### Curcumina

La *Curcuma longa* L., de la familia de las Zingiberáceas, es una planta de origen asiático cuyo rizoma, es usada comúnmente como una especia en la cultura asiática, donde está considerada como una planta mágica dadas sus características organolépticas y sus indudables propiedades terapéuticas y protectoras, sobre todo a nivel hepático y cutáneo. La curcumina (diferuloilmetano) es la sustancia causante del color amarillo característico de esta planta, y es uno de los ingredientes activos responsable de su actividad biológica. Son muchas las propiedades atribuidas a los extractos de *Curcuma longa* y a su principal componente la curcumina. Esta planta ha sido aplicada para la protección y curación de afecciones cutáneas, hepáticas, frente a úlceras, alteraciones digestivas y contra parásitos intestinales, como remedio de venenos y de picaduras de serpientes y frente a distintas dolencias<sup>337</sup>.



**Figura 81.** Estructuras químicas de la curcumina, resveratrol, tirosol, hidroxitirosol, quercetina y ácido gálico.

## Resultados y discusión

Como resultado de colaboraciones con los grupos de investigación de los Dres. Juan Carlos Morales (IPBLN-CSIC) y Andrés Parra (UGR), pudimos evaluar la actividad *in vitro* de numerosos derivados de alquil y glicosil de compuestos naturales en las formas sanguíneas de *T. brucei*.

En primer lugar, ensayamos derivados de la quercetina, la curcumina, el resveratrol y el ac. gálico.

**Tabla 17.** Actividades tripanocidas de los derivados de la quercetina (Q), la curcumina (C), el resveratrol (R) y el ac. Gálico (AG).

Derivados	EC <sub>50</sub> (μM)
<b>Quercetina</b>	19,3 ± 4.2
<b>Derivado Q1</b>	> 50
<b>Derivado Q2</b>	> 50
<b>Derivado Q3</b>	> 50
<b>Curcumina</b>	3.9 ± 0.02
<b>Derivado C1</b>	8.1 ± 2.4
<b>Derivado C2</b>	3.64 ± 0.50
<b>Derivado C3</b>	30.2 ± 13.9
<b>Resveratrol</b>	17.7 ± 5.9
<b>Derivado R1</b>	> 50
<b>Derivado R2</b>	> 50
<b>Derivado R3</b>	> 50
<b>Derivado R4</b>	> 50
<b>Derivado R5</b>	> 50
<b>Derivado R6</b>	> 50
<b>Derivado R7</b>	3.95 ± 0.54
<b>Derivado R8</b>	1.95 ± 0.86
<b>Derivado R9</b>	2.16 ± 0.88
<b>Derivado R10</b>	0.23 ± 0.06
<b>Derivado R11</b>	0.36 ± 0.02
<b>Derivado R12</b>	2.69 ± 0.18
<b>Derivado R13</b>	3.34 ± 0.95
<b>Derivado AG1</b>	44.1 ± 5,4
<b>Derivado AG 2</b>	15.5 ± 4,6
<b>Derivado AG 3</b>	4.1 ± 0,3
<b>Derivado AG 4</b>	26.6 ± 2,5
<b>Derivado AG 5</b>	16.7 ± 3,5
<b>Derivado AG 6</b>	7.1 ± 1,2



Como se observa en la tabla 17, los derivados de la quercetina mostraron  $EC_{50}$  superiores a 50  $\mu M$ , mayores que los compuestos originales. Los derivados de la curcumina, resveratrol y ácido gálico que presentaron mayores actividades tripanocidas tuvieron  $EC_{50}$  que oscilaban entre los  $3.64 \pm 0.50 \mu M$ , los  $0.23 \pm 0.058 \mu M$  y los  $4,1 \pm 0,3$ , respectivamente.

Posteriormente estudiamos la capacidad tripanocida de derivados del tirosol e hidroxitirosol.

**Tabla 18.** Actividades tripanocidas de los derivados del tirosol y el hidroxitirosol.

Tirosol e hidroxitirosol	$EC_{50}$ ( $\mu M$ )	Tirosol e hidroxitirosol	$EC_{50}$ ( $\mu M$ )
<b>Tirosol</b>	>10	<b>Derivado 28</b>	$0.74 \pm 0.36$
<b>Hidroxitirosol</b>	$47.5 \pm 16.9$	<b>Derivado 29</b>	$0.77 \pm 0.28$
<b>Derivado 1</b>	$79.4 \pm 23.1$	<b>Derivado 30</b>	> 10
<b>Derivado 2</b>	$59.1 \pm 2.3$	<b>Derivado 31</b>	$8.74 \pm 1.15$
<b>Derivado 3</b>	$56.8 \pm 8.3$	<b>Derivado 32</b>	$9.42 \pm 0.26$
<b>Derivado 4</b>	$81.4 \pm 19.3$	<b>Derivado 33</b>	> 10
<b>Derivado 5</b>	$16.2 \pm 3.8$	<b>Derivado 34</b>	$4.11 \pm 0.22$
<b>Derivado 6</b>	$61.5 \pm 23.8$	<b>Derivado 35</b>	$5.69 \pm 0.71$
<b>Derivado 7</b>	$41.6 \pm 12.6$	<b>Derivado 36</b>	$5.68 \pm 0.67$
<b>Derivado 8</b>	$0.038 \pm 0.003$	<b>Derivado 37</b>	> 10
<b>Derivado 9</b>	$0.026 \pm 0.002$	<b>Derivado 38</b>	$8.08 \pm 0.53$
<b>Derivado 10</b>	$43.4 \pm 14.0$	<b>Derivado 39</b>	$6.19 \pm 0.52$
<b>Derivado 11</b>	$9.4 \pm 1.4$	<b>Derivado 40</b>	$6.42 \pm 0.47$
<b>Derivado 12</b>	$9.6 \pm 0.8$	<b>Derivado 41</b>	> 10
<b>Derivado 13</b>	$0.6 \pm 0.24$	<b>Derivado 42</b>	$4.10 \pm 0.18$
<b>Derivado 14</b>	$0.36 \pm 0.01$	<b>Derivado 43</b>	$1.45 \pm 0.22$
<b>Derivado 15</b>	$2.29 \pm 0.48$	<b>Derivado 44</b>	$3.78 \pm 0.17$
<b>Derivado 16</b>	$2.43 \pm 0.33$	<b>Derivado 45</b>	$3.95 \pm 0.18$
<b>Derivado 17</b>	$62.3 \pm 16.8$	<b>Derivado 46</b>	$2.10 \pm 0.06$
<b>Derivado 18</b>	>10	<b>Derivado 47</b>	$1.00 \pm 0.04$
<b>Derivado 19</b>	>10	<b>Derivado 48</b>	> 10
<b>Derivado 20</b>	>10	<b>Derivado 49</b>	> 10
<b>Derivado 21</b>	>10	<b>Derivado 50</b>	$1.41 \pm 0.71$
<b>Derivado 22</b>	$1.29 \pm 0.21$	<b>Derivado 51</b>	$7.23 \pm 2.30$
<b>Derivado 23</b>	$0.63 \pm 0.07$	<b>Derivado 52</b>	$0.18 \pm 0.03$
<b>Derivado 24</b>	>10	<b>Derivado 53</b>	$0.53 \pm 0.22$
<b>Derivado 25</b>	>10	<b>Derivado 54</b>	$1.07 \pm 0.51$
<b>Derivado 26</b>	>10	<b>Derivado 55</b>	$1.43 \pm 0.08$
<b>Derivado 27</b>	$9.87 \pm 1.02$	<b>Derivado 56</b>	$6.15 \pm 2.86$



Como se observa en la tabla 18, algunos de estos derivados mostraron una prometedora actividad a concentraciones submicromolares. Entre ellos, los derivados 8 y 9 fueron los más activos con  $EC_{50}$   $0.038 \pm 0.003$   $\mu$ M y  $0.026 \pm 0.002$ , respectivamente.

Aunque el establecimiento de relaciones estructura-actividad no es el objetivo de esta tesis, podemos resumir que variaciones en el número de grupos OH fenólicos, el tipo de enlace químico entre el anillo fenólico y la cadena de alquilo, así como la longitud de la cadena de alquilo, fueron esenciales para la actividad tripanocida de estos análogos del tirosol y el hidroxitirosol.

# Evaluación de ligandos de G-Quadruplex como nuevos agentes tripanocidas

Los resultados del siguiente capítulo forman parte del artículo:

**“ G-Quadruplex Identification in the Genome of Protozoan Parasites Points to Naphthalene Diimide Ligands as New Antiparasitic Agents”**. Publicados en: J Med Chem. 2018.

**“Structure-activity studies on carbohydrate naphthalene diimide conjugates as potential antiparasitic drugs”**. Submitted.

## Antecedentes

Las estructuras secundarias G-quadruplexe se forman en los ácidos nucleicos por secuencias que son ricas en guanina. Son estructuras helicoidales que contienen tétradas de guanina que pueden formarse a partir de una, dos o cuatro cadenas. Las formas unimoleculares a menudo se producen de forma natural cerca de las regiones teloméricas. Cuatro bases de guanina pueden asociarse a través del enlace de hidrógeno Hoogsteen para formar una estructura cuadrada plana llamada tétrada de guanina (también llamada tétrada G o cuarteto G), y dos o más tétradas de guanina pueden apilarse una sobre otra para formar un cuadruplex G<sup>338,339</sup>.

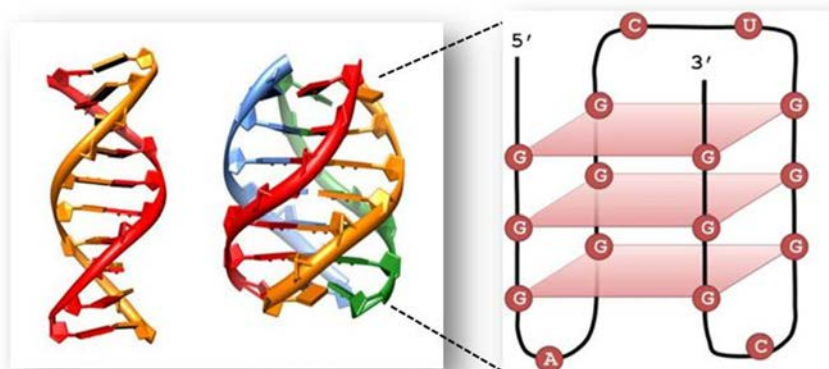
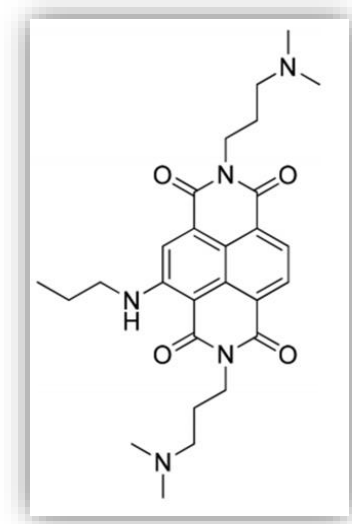


Figura 82. Dúplex y cuádruplex de ADN

En base a evidencias experimentales reunidas en la última década, que demuestran que la actividad de la mayoría de los oncogenes es controlada por G4, la industria farmacéutica se encuentra interesada en el desarrollo de moléculas dirigidas a estas estructuras en busca de posibles drogas antitumorales.

Sin embargo, hasta el momento, las drogas ensayadas no discriminan entre los oncogenes y otros genes controlados por G4, ya que se unen a todos los G4 presentes en el genoma.



**Figura 83.** Ejemplo de ligando tipo

Por otra parte, podría existir un papel no explorado de G4 en el cambio antigénico de las VSG en *T. brucei*, ya que los potenciales sitios de formación de G4, telómeros ricos en guanina, facilitan el cambio de genes de virulencia VSG. Por lo tanto, los G4 de *T. brucei* podrían ser modelos útiles para futuros estudios<sup>340</sup>.

## Resultados y discusión

Fruto de la colaboración con el grupo del Dr. Juan Carlos Morales (IPBLN-CSIC), que había identificado la presencia de G4 en el genoma de *T. brucei*, y del Dr. Mauro Freccero (Universidad de Pavia), ensayamos la actividad tripanocida de posibles ligandos de estas estructuras. La síntesis de estos ligandos, basados en naphthalenediimides (NDI) conjugados a azúcares, y la demostración de su interacción con los G4 de *T. brucei* fue llevada a cabo por nuestros colaboradores. La actividad tripanocida *in vitro* de los posibles ligandos G4, se evaluó en las formas sanguíneas de *T. b. brucei* mediante ensayos de alamar blue y las EC<sub>50</sub> se muestran a continuación, en la siguiente tabla.

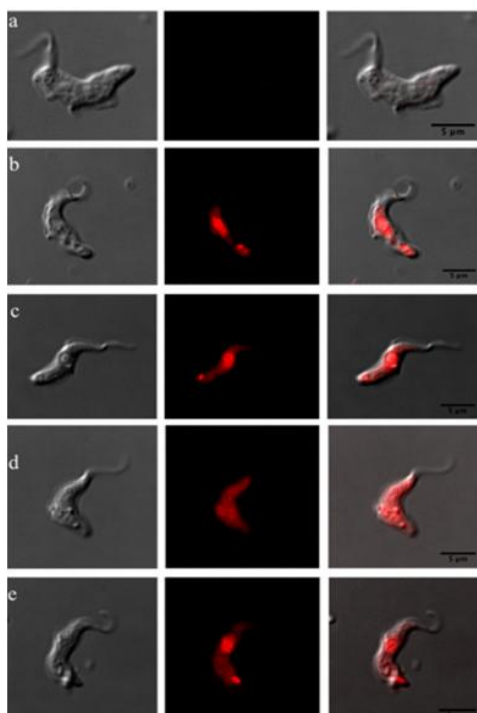
**Tabla 19.** Actividades tripanocidas de los ligandos G4.

Ligando G4 putativo	EC <sub>50</sub> (μM)
<b>G4-1</b>	0.024 ± 0.001
<b>G4-2</b>	0.089 ± 0.007
<b>G4-3</b>	0.017 ± 0.007
<b>G4-4</b>	0.099 ± 0.010
<b>G4-5</b>	0.021 ± 0.003
<b>G4-6</b>	0.017 ± 0.009
<b>G4-7</b>	0.009 ± 0.001



Como puede apreciarse, los ligandos G4 tuvieron una buena actividad tripanocida, en el rango nanomolar. De manera interesante, nuestros colaboradores demostraron usando células MRC-5 que algunos de estos compuestos presentaban índices de selectividad mayores de 40, así como una baja toxicidad en el modelo de pez cebra.

A continuación, aprovechando la fluorescencia intrínseca de estos compuestos, analizamos la localización subcelular en *T. Brucei* mediante microscopía confocal. Para ello, se incubaron parásitos en fase logarítmica de crecimiento y se incubaron con los compuestos de interés durante 30 y 150 minutos a 37°C. Tras la incubación, los parásitos se lavaron dos veces con PBS y se fijaron con PFA 2% durante 1 h a 4°C. Como muestra la figura 84, ambos compuestos se localizaron en núcleo y kinetoplasto, lugares donde se encuentran las supuestas dianas G4.



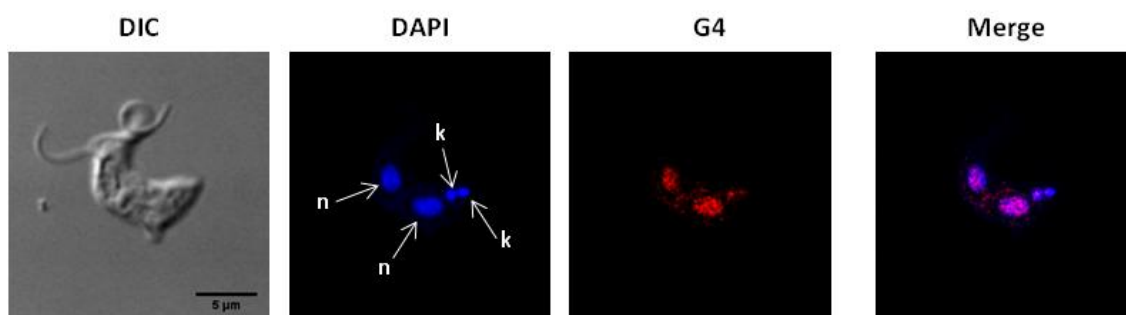
**Figura 84. Localización celular.** Imágenes confocales de *T. brucei* después de la incubación con 5 µM de G4-6 durante 30 min (b) o 150 min (c) y con G4-7 durante 30 min (d) o 150 min (e). Los controles se observan en el panel (a). Barra de escala: 5 µm.

Posteriormente estudiamos la actividad tripanocida de nuevos derivados de NDI sintetizados por el grupo del Dr. Mauro Freccero (Universidad de Pavia), en los que se modificó la distancia entre el azúcar y el núcleo de NDI con el fin de reducir el efecto estérico comparado con los compuestos anteriores

**Tabla 20.** Actividades tripanocidas de los ligandos G4.

Ligando G4 putativo	EC <sub>50</sub> (μM)
<b>G4-8</b>	0.22 ± 0.01
<b>G4-9</b>	0.06 ± 0.01
<b>G4-10</b>	0.44 ± 0.05
<b>G4-11</b>	0.15 ± 0.05
<b>G4-12</b>	0.24 ± 0.05
<b>G4-13</b>	0.35 ± 0.11

De igual manera, se aprovechó la fluorescencia intrínseca de estos compuestos y se analizó la localización subcelular en *T. brucei* del que mejor actividad tripanocida tuvo, observándose que de nuevo el compuesto colocalizaba con el marcador de ADN DAPI, en el núcleo y kinetoplasto del parásito.



**Figura 85.** Imágenes confocales de *T. brucei* después de la incubación con 5 μM de G4-9 durante 30 min. Barra de escala: 5 μm.

Nuestros resultados muestran que los ligandos de G4 pueden constituir un nuevo tipo de compuestos tripanocidas.









---

## CONCLUSIONES

---



## Conclusiones

---

- I. El genoma de *Leishmania major* contiene un gen ABC que codifica una proteína llamada LmABCB3 que presenta similitud significativa con los transportadores humanos ABCB6 y ABCB7 (ATM1), involucrados en el transporte de porfirinas y en el ensamblaje de clústeres Fe/S, respectivamente. La topología de LmABCB3 es atípica ya que contiene una Extensión N-terminal Única (UNE) que no está presente en ninguna otra proteína ABC ni en ningún otro genoma secuenciado, incluidos los de los organismos relacionados *Trypanosoma brucei* y *Trypanosoma cruzi*.
- II. LmABCB3 se localiza en la mitocondria del parásito y para su adecuado tráfico a este organelo requiere la presencia de la región UNE.
- III. La sobreexpresión de un mutante inactivo de LmABCB3 provoca un efecto dominante negativo letal para las formas promastigotas del parásito. Además, la delección heterocigota de un alelo de *LmABCB3* reduce la replicación de *L. major* como amastigotes intracelulares y disminuye la virulencia del parásito en un modelo murino de leishmaniasis cutánea.
- IV. LmABCB3 interacciona con hemo y se requiere para la síntesis mitocondrial de esta porfirina.
- V. LmABCB3 complementa la función de ATM1 en *Saccharomyces cerevisiae*, demostrando por un lado su papel esencial en la biogénesis de clústeres Fe/S citosólicos y nucleares y, por otro, que funciona como un homodímero ubicado en la membrana mitocondrial interna, con los NBDs de cara a la matriz mitocondrial.
- VI. LmABCB3 presenta un bolsillo cargado positivamente, con capacidad de interactuar con tripanotión, que contiene aminoácidos esenciales para su función. Por lo tanto, LmABCB3 podría transportar un complejo T(SH)<sub>2</sub>-X



fuera de la mitocondria, necesario para la maduración de clústeres Fe/S citosólicos.

- VII. AS-48 es la primera bacteriocina con actividad frente a las formas sanguíneas de *Trypanosoma brucei brucei*, *Trypanosoma brucei gambiense* y *Trypanosoma brucei rhodesiense*. Mata al parásito a concentraciones nanomolares menores que las requeridas por los fármacos tripanocidas en uso clínico y no presenta toxicidad frente a células humanas.
- VIII. A diferencia de su efecto bactericida, AS-48 no mata al parásito permeabilizando su membrana plasmática. En cambio, AS-48 es captado por *T. brucei* por endocitosis mediada por clatrina tras su interacción con las VSG de la superficie del parásito, induciendo una muerte celular relacionada con autofagia.
- IX. Se ha demostrado la actividad tripanocida *in vitro*, en el rango nanomolar, de diversos compuestos como: i) las aminoquinoleinas sitamaquina y tafenoquina; ii) derivados de compuestos naturales como el tirosol y el hidroxitirosol y iii) posibles ligandos de G-quadruplex del parásito.







---

## **BIBLIOGRAFIA Y ANEXOS**

---



1. Pace, D. Leishmaniasis. *J. Infect.* **69 Suppl 1**, S10-18 (2014).
2. About Leishmaniasis – DNDi. Available at: <https://www.dndi.org/diseases-projects/leishmaniasis/>. (Accessed: 11th August 2017)
3. Alvar, J. *et al.* Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS ONE* **7**, (2012).
4. Von Stebut, E. Leishmaniasis. *JDDG J. Dtsch. Dermatol. Ges.* **13**, 191–201 (2015).
5. Torpiano, P. & Pace, D. Leishmaniasis: diagnostic issues in Europe. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **13**, 1123–1138 (2015).
6. Di Muccio, T. *et al.* Epidemiology of Imported Leishmaniasis in Italy: Implications for a European Endemic Country. *PLoS ONE* **10**, (2015).
7. Akhoundi, M. *et al.* A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **10**, (2016).
8. Botet Fregola Jordi & Portús Vinyenta Montserrat. La leishmaniosis en la España peninsular. Revisión histórica-bibliográfica (1912-1985). *Rev. Esp. Salud Publica* **4**, 255–266 (1993).
9. Otranto, D. & Dantas-Torres, F. The prevention of canine leishmaniasis and its impact on public health. *Trends Parasitol.* **29**, 339–345 (2013).
10. Dhillon, G. P. S., Sharma, S. N. & Nair, B. Kala-azar elimination programme in India. *J. Indian Med. Assoc.* **106**, 664, 666–668 (2008).
11. Ready, P. D. Leishmaniasis emergence in Europe. *Euro Surveill. Bull. Eur. Sur Mal. Transm. Eur. Commun. Dis. Bull.* **15**, 19505 (2010).
12. Molina, R. *et al.* The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain. *Vet. Parasitol.* **190**, 268–271 (2012).
13. Rodriguez-Cortes, A. *et al.* Canine Leishmaniasis Progression is Associated with Vitamin D Deficiency. *Sci. Rep.* **7**, 3346 (2017).
14. Kaszak, I., Planellas, M. & Dworecka-Kaszak, B. Canine leishmaniosis - an emerging disease. *Ann. Parasitol.* **61**, 69–76 (2015).
15. Suárez Rodríguez, B. *et al.* [Review of the current situation and the risk factors of *Leishmania infantum* in Spain]. *Rev. Esp. Salud Publica* **86**, 555–564 (2012).



16. Le Rutte, E. A., van Straten, R. & Overgaauw, P. A. M. Awareness and control of canine leishmaniosis: A survey among Spanish and French veterinarians. *Vet. Parasitol.* **253**, 87–93 (2018).
17. Savoia, D. Recent updates and perspectives on leishmaniasis. *J. Infect. Dev. Ctries.* **9**, 588–596 (2015).
18. Olea, P. & Pinilla, J. [Visceral leishmaniasis in patient with HIV infection]. *Rev. Chil. Infectologia Organo Of. Soc. Chil. Infectologia* **30**, 216–220 (2013).
19. OMS | Leishmaniasis. WHO Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/es/>. (Accessed: 11th August 2017)
20. Fraga, J. *et al.* Evolution and species discrimination according to the Leishmania heat-shock protein 20 gene. *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.* **18**, 229–237 (2013).
21. Borghi, S. M. *et al.* Leishmania infection: painful or painless? *Parasitol. Res.* **116**, 465–475 (2017).
22. Geiger, A. *et al.* Escaping Deleterious Immune Response in Their Hosts: Lessons from Trypanosomatids. *Front. Immunol.* **7**, (2016).
23. Madrid (Comunidad Autónoma), Consejería de Sanidad & Colegio Oficial de Veterinarios de Madrid. *Brote de leishmaniasis en Fuenlabrada y otros municipios de la Comunidad de Madrid: el papel de las liebres y los conejos como reservorios.* (Comunidad de Madrid, Dirección General de Salud Pública, 2017).
24. Späth, G. F., Drini, S. & Rachidi, N. A touch of Zen: post-translational regulation of the Leishmania stress response. *Cell. Microbiol.* **17**, 632–638 (2015).
25. Romero Amarilis, Machuca Claudia, Padrón Nieves Maritza & Ponte Sucre Alicia. Valor pronóstico de los cambios fisiológicos asociados a la quimio-resistencia en Leishmania. *Acad. Bioméd. Digit.* **33**, (2008).
26. Muskus, C. E. & Villa, M. M. Metaciclologénesis: un proceso fundamental en la biología de Leishmania. *Biomédica* **22**, 167–77 (2002).
27. Kumar, R. & Engwerda, C. Vaccines to prevent leishmaniasis. *Clin. Transl. Immunol.* **3**, e13 (2014).

28. Charmoy, M., Auderset, F., Allenbach, C. & Tacchini-Cottier, F. The prominent role of neutrophils during the initial phase of infection by *Leishmania* parasites. *J. Biomed. Biotechnol.* **2010**, 719361 (2010).
29. Nathan, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 173 (2006).
30. Nieves, E. & Rondón, M. Metaciclologénesis y desarrollo de *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) en *Lutzomyia ovallesi* (Diptera: Psychodidae). *Rev. Soc. Venez. Microbiol.* **30**, (2010).
31. Forestier, C.-L., Gao, Q. & Boons, G.-J. *Leishmania* lipophosphoglycan: how to establish structure-activity relationships for this highly complex and multifunctional glycoconjugate? *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **4**, 193 (2014).
32. *Leishmania* survival in the macrophage: where the ends justify the means - ScienceDirect. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369527415000508?via%3Dihub>. (Accessed: 17th January 2018)
33. Cunningham, A. C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *leishmania*. *Exp. Mol. Pathol.* **72**, 132–141 (2002).
34. Oliveira, F., Jochim, R. C., Valenzuela, J. G. & Kamhawi, S. Sand flies, *Leishmania*, and transcriptome-borne solutions. *Parasitol. Int.* **58**, 1–5 (2009).
35. Mbow, M. L., Bleyenbergh, J. A., Hall, L. R. & Titus, R. G. *Phlebotomus papatasi* sand fly salivary gland lysate down-regulates a Th1, but up-regulates a Th2, response in mice infected with *Leishmania major*. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **161**, 5571–5577 (1998).
36. Dey, R. *et al.* Gut Microbes Egested during Bites of Infected Sand Flies Augment Severity of Leishmaniasis via Inflammasome-Derived IL-1 $\beta$ . *Cell Host Microbe* **23**, 134-143.e6 (2018).
37. Blank, C., Fuchs, H., Rappersberger, K., Röllinghoff, M. & Moll, H. Parasitism of epidermal Langerhans cells in experimental cutaneous leishmaniasis with *Leishmania major*. *J. Infect. Dis.* **167**, 418–425 (1993).
38. Tapia, F. J. *et al.* Adhesion molecules in lesions of American cutaneous leishmaniasis. *Exp. Dermatol.* **3**, 17–22 (1994).



39. Tapia, F. J., Cáceres-Dittmar, G. & Sánchez, M. A. Epidermal Immune Privilege in American Cutaneous Leishmaniasis. (1996).
40. Naderer, T. & McConville, M. J. The Leishmania-macrophage interaction: a metabolic perspective. *Cell. Microbiol.* **10**, 301–308 (2008).
41. Laskay, T., van Zandbergen, G. & Solbach, W. Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: apoptosis as infection-promoting factor. *Immunobiology* **213**, 183–191 (2008).
42. Scorza, B. M., Carvalho, E. M. & Wilson, M. E. Cutaneous Manifestations of Human and Murine Leishmaniasis. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 1296 (2017).
43. Unger, A. *et al.* Association of Treatment of American Cutaneous Leishmaniasis Prior to Ulcer Development with High Rate of Failure in Northeastern Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **80**, 574–579 (2009).
44. Rabes, R., Del, T., Baquero-Artigao, F. & García Miguel, M. J. Leishmaniasis cutánea. *Pediatría Aten. Primaria* **12**, 263–271 (2010).
45. Goto, H. & Lindoso, J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **8**, 419–433 (2010).
46. Hashiguchi, Y. *et al.* Diffuse and disseminated cutaneous leishmaniasis: clinical cases experienced in Ecuador and a brief review. *Trop. Med. Health* **44**, 2 (2016).
47. Zijlstra, E. E., Musa, A. M., Khalil, E. a. G., Hassan, I. E. & El-Hassan, A. M. Post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Lancet Infect. Dis.* **3**, 87–98 (2003).
48. Ramesh V & Mukherjee A. POST-KALA-AZAR DERMAL LEISHMANIASIS. *Int. J. Dermatol.* **34**, (1995).
49. Zulfiqar, B., Shelper, T. B. & Avery, V. M. Leishmaniasis drug discovery: recent progress and challenges in assay development. *Drug Discov. Today* **22**, 1516–1531 (2017).
50. Tiwari, N., Gedda, M. R., Tiwari, V. K., Singh, S. P. & Singh, R. K. Limitations of Current Therapeutic Options, Possible Drug Targets and Scope of Natural Products in Control of Leishmaniasis. *Mini Rev. Med. Chem.* **18**, 26–41 (2018).
51. Andrade-Neto, V. V. *et al.* Leishmaniasis treatment: update of possibilities for drug repurposing. *Front. Biosci. Landmark Ed.* **23**, 967–996 (2018).

52. Wyllie, S., Cunningham, M. L. & Fairlamb, A. H. Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. *J. Biol. Chem.* **279**, 39925–39932 (2004).
53. Ouellette, M., Drummelsmith, J. & Papadopolou, B. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. *Drug Resist. Updat. Rev. Comment. Antimicrob. Anticancer Chemother.* **7**, 257–266 (2004).
54. Chappuis, F. *et al.* Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat. Rev. Microbiol.* **5**, 873–882 (2007).
55. Mandal, S., Maharjan, M., Singh, S., Chatterjee, M. & Madhubala, R. Assessing aquaglyceroporin gene status and expression profile in antimony-susceptible and -resistant clinical isolates of *Leishmania donovani* from India. *J. Antimicrob. Chemother.* **65**, 496–507 (2010).
56. Frézard, F., Monte-Neto, R. & Reis, P. G. Antimony transport mechanisms in resistant leishmania parasites. *Biophys. Rev.* **6**, 119–132 (2014).
57. Manzano, J. I., García-Hernández, R., Castanys, S. & Gamarro, F. A new ABC half-transporter in *Leishmania major* is involved in resistance to antimony. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**, 3719–3730 (2013).
58. Manzano, J. I. *et al.* *Leishmania* LABC1 and LABC2 transporters are involved in virulence and oxidative stress: functional linkage with autophagy. *Parasit. Vectors* **10**, 267 (2017).
59. Ashutosh, S., Sundar, S. & Goyal, N. Molecular mechanisms of antimony resistance in *Leishmania*. *J. Med. Microbiol.* **56**, 143–153 (2007).
60. Sundar, S. & Chakravarty, J. An update on pharmacotherapy for leishmaniasis. *Expert Opin. Pharmacother.* **16**, 237–252 (2015).
61. Pérez-Victoria, J. M. *et al.* Sitamaquine Overcomes ABC-Mediated Resistance to Miltefosine and Antimony in *Leishmania*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 3838–3844 (2011).
62. Leandro, C. & Campino, L. Leishmaniasis: efflux pumps and chemoresistance. *Int. J. Antimicrob. Agents* **22**, 352–357 (2003).
63. Ghorbani, M. & Farhoudi, R. Leishmaniasis in humans: drug or vaccine therapy? *Drug Des. Devel. Ther.* **12**, 25–40 (2017).
64. Current Treatments – DNDi. Available at: <https://www.dndi.org/diseases-projects/leishmaniasis/leish-current-treatments/>. (Accessed: 25th January 2018)



65. Coelho, A. C., Messier, N., Ouellette, M. & Cotrim, P. C. Role of the ABC Transporter PRP1 (ABCC7) in Pentamidine Resistance in Leishmania Amastigotes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 3030–3032 (2007).
66. Hellier, I. *et al.* Treatment of Old World Cutaneous Leishmaniasis by Pentamidine Isethionate. *Dermatology* **200**, 120–123 (2000).
67. Basselin, M., Denise, H., Coombs, G. H. & Barrett, M. P. Resistance to pentamidine in Leishmania mexicana involves exclusion of the drug from the mitochondrion. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 3731–3738 (2002).
68. Dorlo, T. P. C., Balasegaram, M., Beijnen, J. H. & de Vries, P. J. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. *J. Antimicrob. Chemother.* **67**, 2576–2597 (2012).
69. Luque-Ortega, J. R. *et al.* Defeating Leishmania resistance to miltefosine (hexadecylphosphocholine) by peptide-mediated drug smuggling: a proof of mechanism for trypanosomatid chemotherapy. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **161**, 835–842 (2012).
70. Pérez-Victoria, F. J., Gamarro, F., Ouellette, M. & Castanys, S. Functional cloning of the miltefosine transporter. A novel P-type phospholipid translocase from Leishmania involved in drug resistance. *J. Biol. Chem.* **278**, 49965–49971 (2003).
71. Pérez-Victoria, J. M. *et al.* Alkyl-lysophospholipid resistance in multidrug-resistant Leishmania tropica and chemosensitization by a novel P-glycoprotein-like transporter modulator. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 2468–2474 (2001).
72. Castanys-Muñoz, E., Pérez-Victoria, J. M., Gamarro, F. & Castanys, S. Characterization of an ABCG-like transporter from the protozoan parasite Leishmania with a role in drug resistance and transbilayer lipid movement. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 3573–3579 (2008).
73. Castanys-Muñoz, E., Alder-Baerens, N., Pomorski, T., Gamarro, F. & Castanys, S. A novel ATP-binding cassette transporter from Leishmania is involved in transport of phosphatidylcholine analogues and resistance to alkyl-phospholipids. *Mol. Microbiol.* **64**, 1141–1153 (2007).
74. Pérez-Victoria, J. M. *et al.* Combination of Suboptimal Doses of Inhibitors Targeting Different Domains of LtrMDR1 Efficiently Overcomes Resistance of Leishmania spp. to Miltefosine by Inhibiting Drug Efflux. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 3102–3110 (2006).



75. de la Torre, B. G. *et al.* A BODIPY-embedding miltefosine analog linked to cell-penetrating Tat(48-60) peptide favors intracellular delivery and visualization of the antiparasitic drug. *Amino Acids* **46**, 1047–1058 (2014).
76. Chungu, C. N., Owate, J., Pamba, H. O. & Donno, L. Treatment of visceral leishmaniasis in Kenya by aminosidine alone or combined with sodium stibogluconate. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **84**, 221–225 (1990).
77. Chawla, B., Jhingran, A., Panigrahi, A., Stuart, K. D. & Madhubala, R. Paromomycin Affects Translation and Vesicle-Mediated Trafficking as Revealed by Proteomics of Paromomycin – Susceptible –Resistant *Leishmania donovani*. *PLoS ONE* **6**, (2011).
78. Bhandari, V., Sundar, S., Dujardin, J. C. & Salotra, P. Elucidation of Cellular Mechanisms Involved in Experimental Paromomycin Resistance in *Leishmania donovani*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **58**, 2580–2585 (2014).
79. Ponte-Sucré, A. *et al.* Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **11**, (2017).
80. van Griensven, J. *et al.* Combination therapy for visceral leishmaniasis. *Lancet Infect. Dis.* **10**, 184–194 (2010).
81. García-Hernández, R., Gómez-Pérez, V., Castanys, S. & Gamarro, F. Fitness of *Leishmania donovani* Parasites Resistant to Drug Combinations. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **9**, e0003704 (2015).
82. OMS | La tripanosomiasis africana (enfermedad del sueño). WHO Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs259/es/>. (Accessed: 2nd February 2018)
83. Geerts, S. & Holmes, P. H. Drug management and parasite resistance in bovine trypanosomiasis in Africa. *Drug Manag. Parasite Resist. Bov. Trypanos. Afr.* (1998).
84. Wen, G. *et al.* PREVALENCE AND RISK FACTORS ASSOCIATED WITH HEMOPARASITES IN CATTLE AND GOATS AT THE EDGE OF KIBALE NATIONAL PARK, WESTERN UGANDA. *J. Parasitol.* **103**, 69–74 (2017).
85. Corral-Corral, I. & Quereda Rodríguez-Navarro, C. [Gustavo Pittaluga and the expedition to study sleeping sickness in the Spanish territories of the Gulf of Guinea (1909)]. *Rev. Neurol.* **54**, 49–58 (2012).
86. Steverding, D. The history of African trypanosomiasis. *Parasit. Vectors* **1**, 3 (2008).



87. African Union | A United and Strong Africa. Available at: <https://au.int/en/pattec>. (Accessed: 17th February 2018)
88. De Gaudenzi, J. G., Noé, G., Campo, V. A., Frasch, A. C. & Cassola, A. Gene expression regulation in trypanosomatids. *Essays Biochem.* **51**, 31–46 (2011).
89. Horn, D. Antigenic variation in African trypanosomes. *Mol. Biochem. Parasitol.* **195**, 123–129 (2014).
90. Mugnier, M. R., Stebbins, C. E. & Papavasiliou, F. N. Masters of Disguise: Antigenic Variation and the VSG Coat in *Trypanosoma brucei*. *PLOS Pathog.* **12**, e1005784 (2016).
91. Pays, E., Vanhollebeke, B., Uzureau, P., Lecordier, L. & Pérez-Morga, D. The molecular arms race between African trypanosomes and humans. *Nat. Rev. Microbiol.* **12**, 575–584 (2014).
92. Vanhollebeke, B. & Pays, E. The trypanolytic factor of human serum: many ways to enter the parasite, a single way to kill. *Mol. Microbiol.* **76**, 806–814 (2010).
93. McCulloch, R., Vassella, E., Burton, P., Boshart, M. & Barry, J. D. Transformation of monomorphic and pleomorphic *Trypanosoma brucei*. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **262**, 53–86 (2004).
94. Cuervo, P., Domont, G. B. & De Jesus, J. B. Proteomics of trypanosomatids of human medical importance. *J. Proteomics* **73**, 845–867 (2010).
95. Mony, B. M. & Matthews, K. R. Assembling the components of the quorum sensing pathway in African trypanosomes. *Mol. Microbiol.* **96**, 220–232 (2015).
96. Caljon, G. *et al.* The Dermis as a Delivery Site of *Trypanosoma brucei* for Tsetse Flies. *PLOS Pathog.* **12**, e1005744 (2016).
97. Trindade, S. *et al.* *Trypanosoma brucei* Parasites Occupy and Functionally Adapt to the Adipose Tissue in Mice. *Cell Host Microbe* **19**, 837–848 (2016).
98. Capewell, P. *et al.* The skin is a significant but overlooked anatomical reservoir for vector-borne African trypanosomes. *eLife* **5**, e17716 (2016).
99. Krüger, T. & Engstler, M. The Fantastic Voyage of the Trypanosome: A Protean Micromachine Perfected during 500 Million Years of Engineering. *Micromachines* **9**, 63 (2018).
100. Pays, E. *et al.* The trypanolytic factor of human serum. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**, 477–486 (2006).
101. Pays, E. & Nolan, D. P. Expression and function of surface proteins in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **91**, 3–36 (1998).

102. Reuner, B., Vassella, E., Yutzy, B. & Boshart, M. Cell density triggers slender to stumpy differentiation of *Trypanosoma brucei* bloodstream forms in culture. *Mol. Biochem. Parasitol.* **90**, 269–280 (1997).
103. Matthews, K. R., McCulloch, R. & Morrison, L. J. The within-host dynamics of African trypanosome infections. *Phil Trans R Soc B* **370**, 20140288 (2015).
104. Borst, P. *et al.* Control of Antigenic Variation in African Trypanosomas. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **58**, 105–114 (1993).
105. Cross, G. A., Wirtz, L. E. & Navarro, M. Regulation of vsg expression site transcription and switching in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **91**, 77–91 (1998).
106. Pérez-Morga, D. *et al.* Apolipoprotein L-I Promotes Trypanosome Lysis by Forming Pores in Lysosomal Membranes. *Science* **309**, 469–472 (2005).
107. Harrington, J. M., Howell, S. & Hajduk, S. L. Membrane Permeabilization by Trypanosome Lytic Factor, a Cytolytic Human High Density Lipoprotein. *J. Biol. Chem.* **284**, 13505–13512 (2009).
108. Vanhollebeke, B. *et al.* A haptoglobin-hemoglobin receptor conveys innate immunity to *Trypanosoma brucei* in humans. *Science* **320**, 677–681 (2008).
109. Cabello-Donayre, M. *et al.* Trypanosomatid parasites rescue heme from endocytosed hemoglobin through lysosomal HRG transporters. *Mol. Microbiol.* **101**, 895–908 (2016).
110. Vanwalleghem, G. *et al.* Coupling of lysosomal and mitochondrial membrane permeabilization in trypanolysis by APOL1. *Nat. Commun.* **6**, (2015).
111. Friedman, D. J. & Pollak, M. R. Genetics of kidney failure and the evolving story of APOL1. (2011). doi:10.1172/JCI46263
112. Kieft, R. *et al.* Mechanism of *Trypanosoma brucei* gambiense (group 1) resistance to human trypanosome lytic factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 16137–16141 (2010).
113. Stødtkilde, K., Torvund-Jensen, M., Moestrup, S. K. & Andersen, C. B. F. Structural basis for trypanosomal haem acquisition and susceptibility to the host innate immune system. *Nat. Commun.* **5**, 5487 (2014).
114. Capewell, P. *et al.* The TgsGP gene is essential for resistance to human serum in *Trypanosoma brucei* gambiense. *PLoS Pathog.* **9**, e1003686 (2013).



115. Capewell, P., Cooper, A., Clucas, C., Weir, W. & Macleod, A. A co-evolutionary arms race: trypanosomes shaping the human genome, humans shaping the trypanosome genome. *Parasitology* **142 Suppl 1**, S108-119 (2015).
116. Uzureau, P. *et al.* Mechanism of *Trypanosoma brucei* gambiense resistance to human serum. *Nature* **501**, 430–434 (2013).
117. Alsford, S., Currier, R. B., Guerra-Assunção, J. A., Clark, T. G. & Horn, D. Cathepsin-L can resist lysis by human serum in *Trypanosoma brucei brucei*. *PLoS Pathog.* **10**, e1004130 (2014).
118. Fontaine, F. *et al.* APOLs with low pH dependence can kill all African trypanosomes. *Nat. Microbiol.* **2**, 1500–1506 (2017).
119. Urech, K., Neumayr, A. & Blum, J. Sleeping Sickness in Travelers - Do They Really Sleep? *PLoS Negl. Trop. Dis.* **5**, e1358 (2011).
120. Simarro, P. P., Franco, J., Diarra, A., Postigo, J. A. R. & Jannin, J. Update on field use of the available drugs for the chemotherapy of human African trypanosomiasis. *Parasitology* **139**, 842–846 (2012).
121. Pohlig, G. *et al.* Efficacy and Safety of Pafuramidine versus Pentamidine Maleate for Treatment of First Stage Sleeping Sickness in a Randomized, Comparator-Controlled, International Phase 3 Clinical Trial. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **10**, e0004363 (2016).
122. Büscher, P., Cecchi, G., Jamonneau, V. & Priotto, G. Human African trypanosomiasis. *Lancet Lond. Engl.* **390**, 2397–2409 (2017).
123. Priotto, G. *et al.* Nifurtimox-eflornithine combination therapy for second-stage African *Trypanosoma brucei* gambiense trypanosomiasis: a multicentre, randomised, phase III, non-inferiority trial. *Lancet Lond. Engl.* **374**, 56–64 (2009).
124. Alirol, E. *et al.* Nifurtimox-eflornithine combination therapy for second-stage gambiense human African trypanosomiasis: Médecins Sans Frontières experience in the Democratic Republic of the Congo. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **56**, 195–203 (2013).
125. Pollastri, M. P. Fexinidazole: A New Drug for African Sleeping Sickness on the Horizon. *Trends Parasitol.* **34**, 178–179 (2018).
126. Wyllie, S. *et al.* Nitroheterocyclic drug resistance mechanisms in *Trypanosoma brucei*. *J. Antimicrob. Chemother.* **71**, 625–634 (2016).

127. Ferguson, M. A. The surface glycoconjugates of trypanosomatid parasites. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **352**, 1295–1302 (1997).
128. Stuart, K. *et al.* Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *J. Clin. Invest.* **118**, 1301–1310 (2008).
129. Landfear, S. M., Tran, K. D. & Sanchez, M. A. Flagellar Membrane Proteins in Kinetoplastid Parasites. *IUBMB Life* **67**, 668–676 (2015).
130. Denny, P. W., Field, M. C. & Smith, D. F. GPI-anchored proteins and glycoconjugates segregate into lipid rafts in Kinetoplastida. *FEBS Lett.* **491**, 148–153 (2001).
131. Roberts, C. W. *et al.* Fatty acid and sterol metabolism: potential antimicrobial targets in apicomplexan and trypanosomatid parasitic protozoa. *Mol. Biochem. Parasitol.* **126**, 129–142 (2003).
132. Yao, C. & Wilson, M. E. Dynamics of sterol synthesis during development of *Leishmania* spp. parasites to their virulent form. *Parasit. Vectors* **9**, (2016).
133. Dauchy, F.-A. *et al.* Trypanosoma brucei CYP51: Essentiality and Targeting Therapy in an Experimental Model. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **10**, e0005125 (2016).
134. de Souza, W. & Rodrigues, J. C. F. Sterol Biosynthesis Pathway as Target for Anti-trypanosomatid Drugs. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases* (2009). doi:10.1155/2009/642502
135. Toledo, J. S. *et al.* Cell homeostasis in a *Leishmania* major mutant overexpressing the spliced leader RNA is maintained by an increased proteolytic activity. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **42**, 1661–1671 (2010).
136. Fenn, K. & Matthews, K. R. The cell biology of *Trypanosoma brucei* differentiation. *Curr. Opin. Microbiol.* **10**, 539–546 (2007).
137. Particularities of mitochondrial structure in parasitic protists (Apicomplexa and Kinetoplastida) - ScienceDirect. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1357272509001290>. (Accessed: 18th February 2018)
138. Stuart, K. RNA editing in kinetoplastid protozoa. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **1**, 412–416 (1991).
139. Schneider, A. Unique aspects of mitochondrial biogenesis in trypanosomatids. *Int. J. Parasitol.* **31**, 1403–1415 (2001).



140. Stuart, K. D., Schnauffer, A., Ernst, N. L. & Panigrahi, A. K. Complex management: RNA editing in trypanosomes. *Trends Biochem. Sci.* **30**, 97–105 (2005).
141. Aphasizhev, R. & Aphasizheva, I. Terminal RNA uridylyltransferases of trypanosomes. *Biochim. Biophys. Acta* **1779**, 270–280 (2008).
142. Piller, K. J., Rusché, L. N. & Sollner-Webb, B. Trypanosoma brucei RNA editing. A full round of uridylyte insertional editing in vitro mediated by endonuclease and RNA ligase. *J. Biol. Chem.* **271**, 4613–4619 (1996).
143. Opperdoes, F. R. & Borst, P. Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in Trypanosoma brucei: The glycosome. *FEBS Lett.* **80**, 360–364 (1977).
144. Parsons, M., Furuya, T., Pal, S. & Kessler, P. Biogenesis and function of peroxisomes and glycosomes. *Mol. Biochem. Parasitol.* **115**, 19–28 (2001).
145. Lander, N., Cordeiro, C., Huang, G. & Docampo, R. Polyphosphate and Acidocalcisomes. *Biochem. Soc. Trans.* **44**, 1–6 (2016).
146. Valente, M. *et al.* Cell cycle regulation and novel structural features of thymidine kinase, an essential enzyme in Trypanosoma brucei. *Mol. Microbiol.* **102**, 365–385 (2016).
147. Timm, J. *et al.* Structural and Kinetic Characterization of Thymidine Kinase from Leishmania major. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **9**, e0003781 (2015).
148. Martínez-García, M. *et al.* LmABCB3, an atypical mitochondrial ABC transporter essential for Leishmania major virulence, acts in heme and cytosolic iron/sulfur clusters biogenesis. *Parasit. Vectors* **9**, (2016).
149. Sousa, A. F. *et al.* Genetic and chemical analyses reveal that trypanothione synthetase but not glutathionylspermidine synthetase is essential for Leishmania infantum. *Free Radic. Biol. Med.* **73**, 229–238 (2014).
150. Korený, L., Lukes, J. & Oborník, M. Evolution of the haem synthetic pathway in kinetoplastid flagellates: an essential pathway that is not essential after all? *Int. J. Parasitol.* **40**, 149–156 (2010).
151. Chiabrando, D., Vinchi, F., Fiorito, V., Mercurio, S. & Tolosano, E. Heme in pathophysiology: a matter of scavenging, metabolism and trafficking across cell membranes. *Front. Pharmacol.* **5**, 61 (2014).

152. Kořený, L., Oborník, M. & Lukeš, J. Make It, Take It, or Leave It: Heme Metabolism of Parasites. *PLOS Pathog.* **9**, e1003088 (2013).
153. Dutta, S., Furuyama, K., Sassa, S. & Chang, K. P. Leishmania spp.: delta-aminolevulinate-inducible neogenesis of porphyria by genetic complementation of incomplete heme biosynthesis pathway. *Exp. Parasitol.* **118**, 629–636 (2008).
154. Opperdoes, F. R. & Coombs, G. H. Metabolism of Leishmania: proven and predicted. *Trends Parasitol.* **23**, 149–158 (2007).
155. Korolnek, T. & Hamza, I. Like iron in the blood of the people: the requirement for heme trafficking in iron metabolism. *Front. Pharmacol.* **5**, 126 (2014).
156. Huynh, C. *et al.* Heme uptake by Leishmania amazonensis is mediated by the transmembrane protein LHR1. *PLoS Pathog.* **8**, e1002795 (2012).
157. Krishnamurthy, G. *et al.* Hemoglobin Receptor in Leishmania Is a Hexokinase Located in the Flagellar Pocket. *J. Biol. Chem.* **280**, 5884–5891 (2005).
158. Campos-Salinas, J. *et al.* A new ATP-binding cassette protein is involved in intracellular haem trafficking in Leishmania. *Mol. Microbiol.* **79**, 1430–1444 (2011).
159. Glavinas, H., Krajcsi, P., Cserepes, J. & Sarkadi, B. The role of ABC transporters in drug resistance, metabolism and toxicity. *Curr. Drug Deliv.* **1**, 27–42 (2004).
160. Higgins, C. F. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu. Rev. Cell Biol.* **8**, 67–113 (1992).
161. Ruiz, J. L. M., Fernandes, L. R., Levy, D. & Bydlowski, S. P. Interrelationship between ATP-binding cassette transporters and oxysterols. *Biochem. Pharmacol.* **86**, 80–88 (2013).
162. Davidson, A. L. & Chen, J. ATP-binding cassette transporters in bacteria. *Annu. Rev. Biochem.* **73**, 241–268 (2004).
163. ABCD proteins | adrenoleukodystrophy.info. Available at: <http://adrenoleukodystrophy.info/mutations-biochemistry/abcd-proteins>. (Accessed: 18th February 2018)
164. Saurin, W., Hofnung, M. & Dassa, E. Getting in or out: early segregation between importers and exporters in the evolution of ATP-binding cassette (ABC) transporters. *J. Mol. Evol.* **48**, 22–41 (1999).



165. Structure of an ABC transporter in complex with its binding protein | Nature. Available at: <https://www.nature.com/articles/nature05626>. (Accessed: 18th February 2018)
166. Dawson, R. J. P., Hollenstein, K. & Locher, K. P. Uptake or extrusion: crystal structures of full ABC transporters suggest a common mechanism. *Mol. Microbiol.* **65**, 250–257 (2007).
167. Lu, G., Westbrook, J. M., Davidson, A. L. & Chen, J. ATP hydrolysis is required to reset the ATP-binding cassette dimer into the resting-state conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 17969–17974 (2005).
168. Oswald, C., Holland, I. B. & Schmitt, L. The motor domains of ABC-transporters. What can structures tell us? *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **372**, 385–399 (2006).
169. Morales-Pérez, M., García-Milian, A. J., Morales-Pérez, M. & García-Milian, A. J. Papel de la superfamilia ABC en la resistencia farmacológica. *Horiz. Sanit.* **16**, 93–101 (2017).
170. Wenzel, J. J., Piehler, A. & Kaminski, W. E. ABC A-subclass proteins: gatekeepers of cellular phospho- and sphingolipid transport. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* **12**, 3177–3193 (2007).
171. Honorat, M. *et al.* Multidrug resistance ABC transporter structure predictions by homology modeling approaches. *Curr. Drug Metab.* **12**, 268–277 (2011).
172. Seguin Alexandra & McVey Ward Diane. Mitochondrial ABC Transporters and Iron Metabolism. *Clin. Exp. Pathol.* **8**, (2018).
173. Zutz, A., Gompf, S., Schägger, H. & Tampé, R. Mitochondrial ABC proteins in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* **1787**, 681–690 (2009).
174. Kiss, K. *et al.* Role of the N-terminal transmembrane domain in the endo-lysosomal targeting and function of the human ABCB6 protein. *Biochem. J.* **467**, 127–139 (2015).
175. Fukuda, Y. *et al.* The severity of hereditary porphyria is modulated by the porphyrin exporter and Lan antigen ABCB6. *Nat. Commun.* **7**, 12353 (2016).
176. Helias, V. *et al.* ABCB6 is dispensable for erythropoiesis and specifies the new blood group system Langereis. *Nat. Genet.* **44**, 170–173 (2012).
177. Egan, E. S. *et al.* Erythrocytes lacking the Langereis blood group protein ABCB6 are resistant to the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Commun. Biol.* **1**, 45 (2018).
178. Gómez, M. A. *et al.* Leishmania panamensis infection and antimonial drugs modulate expression of macrophage drug transporters and metabolizing enzymes: impact on intracellular parasite survival. *J. Antimicrob. Chemother.* **69**, 139–149 (2014).



179. Barrera, M. C. *et al.* Profiling gene expression of antimony response genes in *Leishmania* (*Viannia*) *panamensis* and infected macrophages and its relationship with drug susceptibility. *Acta Trop.* **176**, 355–363 (2017).
180. Chen, C.-A. & Cowan, J. A. Characterization of the soluble domain of the ABC7 type transporter *Atm1*. *J. Biol. Chem.* **278**, 52681–52688 (2003).
181. Chen, C.-A. & Cowan, J. A. Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* *Atm1p*: functional studies of an ABC7 type transporter. *Biochim. Biophys. Acta* **1760**, 1857–1865 (2006).
182. Srinivasan, V., Pierik, A. J. & Lill, R. Crystal structures of nucleotide-free and glutathione-bound mitochondrial ABC transporter *Atm1*. *Science* **343**, 1137–1140 (2014).
183. Lee, J. Y., Yang, J. G., Zhitnitsky, D., Lewinson, O. & Rees, D. C. Structural basis for heavy metal detoxification by an *Atm1*-type ABC exporter. *Science* **343**, 1133–1136 (2014).
184. Schaedler, T. A. *et al.* Structures and functions of mitochondrial ABC transporters. *Biochem. Soc. Trans.* **43**, 943–951 (2015).
185. Sauvage, V., Aubert, D., Escotte-Binet, S. & Villena, I. The role of ATP-binding cassette (ABC) proteins in protozoan parasites. *Mol. Biochem. Parasitol.* **167**, 81–94 (2009).
186. Leprohon, P., Légaré, D., Girard, I., Papadopoulou, B. & Ouellette, M. Modulation of *Leishmania* ABC Protein Gene Expression through Life Stages and among Drug-Resistant Parasites. *Eukaryot. Cell* **5**, 1713–1725 (2006).
187. Parodi-Talice, A. *et al.* The overexpression of a new ABC transporter in *Leishmania* is related to phospholipid trafficking and reduced infectivity. *Biochim. Biophys. Acta* **1612**, 195–207 (2003).
188. Araújo-Santos, J. M., Parodi-Talice, A., Castanys, S. & Gamarro, F. The overexpression of an intracellular ABCA-like transporter alters phospholipid trafficking in *Leishmania*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **330**, 349–355 (2005).
189. Katakura, K. *et al.* Overexpression of LaMDR2, a novel multidrug resistance ATP-binding cassette transporter, causes 5-fluorouracil resistance in *Leishmania amazonensis*. *FEBS Lett.* **561**, 207–212 (2004).
190. Horáková, E., Changmai, P., Paris, Z., Salmon, D. & Lukeš, J. Simultaneous depletion of *Atm* and *Mdl* rebalances cytosolic Fe-S cluster assembly but not heme import into the mitochondrion of *Trypanosoma brucei*. *FEBS J.* **282**, 4157–4175 (2015).



191. Ouellette, M., Haimeur, A., Grondin, K., Légaré, D. & Papadopoulou, B. Amplification of ABC transporter gene *pgpA* and of other heavy metal resistance genes in *Leishmania tarentolae* and their study by gene transfection and gene disruption. *Methods Enzymol.* **292**, 182–193 (1998).
192. Leprohon, P. *et al.* Gene expression modulation is associated with gene amplification, supernumerary chromosomes and chromosome loss in antimony-resistant *Leishmania infantum*. *Nucleic Acids Res.* **37**, 1387–1399 (2009).
193. Lüscher, A., Nerima, B. & Mäser, P. Combined contribution of TbAT1 and TbMRPA to drug resistance in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **150**, 364–366 (2006).
194. Delespaulx, V. & de Koning, H. P. Drugs and drug resistance in African trypanosomiasis. *Drug Resist. Updat. Rev. Comment. Antimicrob. Anticancer Chemother.* **10**, 30–50 (2007).
195. Campos-Salinas, J. *et al.* LABC2, a new ABC transporter implicated in phosphatidylserine exposure, is involved in the infectivity and pathogenicity of *Leishmania*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **7**, e2179 (2013).
196. Arcari, T., Manzano, J. I. & Gamarro, F. ABC13 Is a New Mitochondrial ABC Transporter from *Leishmania major* Involved in Susceptibility to Antimonials and Infectivity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **61**, (2017).
197. Ali, V. & Nozaki, T. Iron-sulphur clusters, their biosynthesis, and biological functions in protozoan parasites. *Adv. Parasitol.* **83**, 1–92 (2013).
198. Ali, V., Shigeta, Y., Tokumoto, U., Takahashi, Y. & Nozaki, T. An intestinal parasitic protist, *Entamoeba histolytica*, possesses a non-redundant nitrogen fixation-like system for iron-sulfur cluster assembly under anaerobic conditions. *J. Biol. Chem.* **279**, 16863–16874 (2004).
199. Gill, E. E. *et al.* Novel mitochondrion-related organelles in the anaerobic amoeba *Mastigamoeba balamuthi*. *Mol. Microbiol.* **66**, 1306–1320 (2007).
200. Lill, R. Function and biogenesis of iron-sulphur proteins. *Nature* **460**, 831–838 (2009).
201. Colasante, C., Peña Diaz, P., Clayton, C. & Voncken, F. Mitochondrial carrier family inventory of *Trypanosoma brucei brucei*: Identification, expression and subcellular localisation. *Mol. Biochem. Parasitol.* **167**, 104–117 (2009).
202. Mammalian Frataxin Controls Sulfur Production and Iron Entry during de Novo FeS<sub>4</sub> Cluster Assembly - Journal of the American Chemical Society (ACS Publications). Available at: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ja308736e>. (Accessed: 12th February 2018)

203. Stehling, O. & Lill, R. The Role of Mitochondria in Cellular Iron–Sulfur Protein Biogenesis: Mechanisms, Connected Processes, and Diseases. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5**, a011312 (2013).
204. Uzarska, M. A., Dutkiewicz, R., Freibert, S.-A., Lill, R. & Mühlenhoff, U. The mitochondrial Hsp70 chaperone Ssq1 facilitates Fe/S cluster transfer from Isu1 to Grx5 by complex formation. *Mol. Biol. Cell* **24**, 1830–1841 (2013).
205. Lukeš, J. & Basu, S. Fe/S protein biogenesis in trypanosomes - A review. *Biochim. Biophys. Acta* **1853**, 1481–1492 (2015).
206. Lange, H. *et al.* An essential function of the mitochondrial sulfhydryl oxidase Erv1p/ALR in the maturation of cytosolic Fe/S proteins. *EMBO Rep.* **2**, 715–720 (2001).
207. Villavicencio-Queijeiro, A. La mitocondria como fábrica de cofactores: biosíntesis de grupo hemo, centros Fe-S y nucleótidos de flavina (FMN/FAD). *TIP Rev. Espec. En Cienc. Quím.-Biológicas* **15**, 116–132 (2012).
208. Brennand, A., Rico, E. & Michels, P. A. M. Autophagy in Trypanosomatids. *Cells* **1**, 346–371 (2012).
209. HADb : Autophagy. Available at: <http://autophagy.lu/autophagy>. (Accessed: 21st February 2018)
210. Yu, L., Chen, Y. & Tooze, S. A. Autophagy pathway: Cellular and molecular mechanisms. *Autophagy* **0**, 1–9 (2017).
211. Williams, R. A. M., Woods, K. L., Juliano, L., Mottram, J. C. & Coombs, G. H. Characterisation of unusual families of ATG8-like proteins and ATG12 in the protozoan parasite *Leishmania major*. *Autophagy* **5**, 159–172 (2009).
212. Delgado, M., Anderson, P., Garcia-Salcedo, J. A., Caro, M. & Gonzalez-Rey, E. Neuropeptides kill African trypanosomes by targeting intracellular compartments and inducing autophagic-like cell death. *Cell Death Differ.* **16**, 406–416 (2009).
213. Bahar, A. A. & Ren, D. Antimicrobial peptides. *Pharm. Basel Switz.* **6**, 1543–1575 (2013).
214. Torrent, M., Pulido, D., Rivas, L. & Andreu, D. Antimicrobial peptide action on parasites. *Curr. Drug Targets* **13**, 1138–1147 (2012).



215. Yang, D., Biragyn, A., Hoover, D. M., Lubkowski, J. & Oppenheim, J. J. Multiple roles of antimicrobial defensins, cathelicidins, and eosinophil-derived neurotoxin in host defense. *Annu. Rev. Immunol.* **22**, 181–215 (2004).
216. Hale, J. D. F. & Hancock, R. E. W. Alternative mechanisms of action of cationic antimicrobial peptides on bacteria. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **5**, 951–959 (2007).
217. Dobson, A., Cotter, P. D., Ross, R. P. & Hill, C. Bacteriocin Production: a Probiotic Trait? *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 1–6 (2012).
218. Alvarez-Sieiro, P., Montalbán-López, M., Mu, D. & Kuipers, O. P. Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **100**, 2939–2951 (2016).
219. Chen, H. & Hoover, D. G. Pressure inactivation kinetics of *Yersinia enterocolitica* ATCC 35669. *Int. J. Food Microbiol.* **87**, 161–171 (2003).
220. Cleveland, J., Montville, T. J., Nes, I. F. & Chikindas, M. L. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.* **71**, 1–20 (2001).
221. Gálvez, A., Giménez-Gallego, G., Maqueda, M. & Valdivia, E. Purification and amino acid composition of peptide antibiotic AS-48 produced by *Streptococcus* (*Enterococcus*) *faecalis* subsp. *liquefaciens* S-48. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**, 437–441 (1989).
222. Abriouel, H., Valdivia, E., Gálvez, A. & Maqueda, M. Response of *Salmonella choleraesuis* LT2 spheroplasts and permeabilized cells to the bacteriocin AS-48. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 4623–4626 (1998).
223. Mota-Meira, M., LaPointe, G., Lacroix, C. & Lavoie, M. C. MICs of mutacin B-Ny266, nisin A, vancomycin, and oxacillin against bacterial pathogens. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 24–29 (2000).
224. Cebrián, R. *et al.* The bacteriocin AS-48 requires dimer dissociation followed by hydrophobic interactions with the membrane for antibacterial activity. *J. Struct. Biol.* **190**, 162–172 (2015).
225. Sánchez-Barrena, M. J. *et al.* Structure of bacteriocin AS-48: from soluble state to membrane bound state. *J. Mol. Biol.* **334**, 541–549 (2003).
226. Khan, H., Flint, S. & Yu, P.-L. Enterocins in food preservation. *Int. J. Food Microbiol.* **141**, 1–10 (2010).
227. Maqueda, M. *et al.* Peptide AS-48: prototype of a new class of cyclic bacteriocins. *Curr. Protein Pept. Sci.* **5**, 399–416 (2004).

228. Sánchez-Hidalgo, M. *et al.* AS-48 bacteriocin: close to perfection. *Cell. Mol. Life Sci.* **68**, 2845–2857 (2011).
229. Abengózar, M. Á. *et al.* Enterocin AS-48 as Evidence for the Use of Bacteriocins as New Leishmanicidal Agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **61**, (2017).
230. Ha, D. S., Schwarz, J. K., Turco, S. J. & Beverley, S. M. Use of the green fluorescent protein as a marker in transfected Leishmania. *Mol. Biochem. Parasitol.* **77**, 57–64 (1996).
231. Allen, C. L., Goulding, D. & Field, M. C. Clathrin-mediated endocytosis is essential in *Trypanosoma brucei*. *EMBO J.* **22**, 4991–5002 (2003).
232. Carvalho, S. *et al.* Heme as a source of iron to Leishmania infantum amastigotes. *Acta Trop.* **109**, 131–135 (2009).
233. Maqueda, M., Gálvez, A., Martínez-Bueno, M., Guerra, I. & Valdivia, E. Neutralizing antibodies against the peptide antibiotic AS-48: immunocytological studies. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**, 148–151 (1993).
234. Landeira, D., Bart, J.-M., Van Tyne, D. & Navarro, M. Cohesin regulates VSG monoallelic expression in trypanosomes. *J. Cell Biol.* **186**, 243–254 (2009).
235. Gietz, R. D. & Woods, R. A. Yeast transformation by the LiAc/SS Carrier DNA/PEG method. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **313**, 107–120 (2006).
236. Sereno, D., Roy, G., Lemesre, J. L., Papadopolou, B. & Ouellette, M. DNA transformation of Leishmania infantum axenic amastigotes and their use in drug screening. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 1168–1173 (2001).
237. García-Sánchez, S., Sánchez-Cañete, M. P., Gamarro, F. & Castanys, S. Functional role of evolutionarily highly conserved residues, N-glycosylation level and domains of the Leishmania miltefosine transporter-Cdc50 subunit. *Biochem. J.* **459**, 83–94 (2014).
238. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods San Diego Calif* **25**, 402–408 (2001).
239. Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. *Molecular cloning: A laboratory manual.* **61**, (Cold spring harbor laboratory press., 1990).
240. Aslett, M. *et al.* TriTrypDB: a functional genomic resource for the Trypanosomatidae. *Nucleic Acids Res.* **38**, D457-462 (2010).



241. Pérez-Victoria, I. *et al.* Non-reducing trisaccharide fatty acid monoesters: novel detergents in membrane biochemistry. *Biochim. Biophys. Acta* **1808**, 717–726 (2011).
242. Carvalho, L. *et al.* The Oral Antimalarial Drug Tafenoquine Shows Activity against *Trypanosoma brucei*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **59**, 6151–6160 (2015).
243. Bart, J.-M. *et al.* Localization of serum resistance-associated protein in *Trypanosoma brucei rhodesiense* and transgenic *Trypanosoma brucei brucei*. *Cell. Microbiol.* **17**, 1523–1535 (2015).
244. Gonzalez-Rey, E., Chorny, A., Varela, N., O'Valle, F. & Delgado, M. Therapeutic effect of urocortin on collagen-induced arthritis by down-regulation of inflammatory and Th1 responses and induction of regulatory T cells. *Arthritis Rheum.* **56**, 531–543 (2007).
245. Krishnamurthy, P. C. *et al.* Identification of a mammalian mitochondrial porphyrin transporter. *Nature* **443**, 586–589 (2006).
246. Rastrojo, A. *et al.* The transcriptome of *Leishmania major* in the axenic promastigote stage: transcript annotation and relative expression levels by RNA-seq. *BMC Genomics* **14**, 223 (2013).
247. Kelley, L. A. & Sternberg, M. J. E. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat. Protoc.* **4**, 363–371 (2009).
248. Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P. & Ponting, C. P. SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 5857–5864 (1998).
249. McGuffin, L. J., Bryson, K. & Jones, D. T. The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **16**, 404–405 (2000).
250. Jones, D. T., Taylor, W. R. & Thornton, J. M. A model recognition approach to the prediction of all-helical membrane protein structure and topology. *Biochemistry (Mosc.)* **33**, 3038–3049 (1994).
251. Ettema, T. J. G., Huynen, M. A., de Vos, W. M. & van der Oost, J. TRASH: a novel metal-binding domain predicted to be involved in heavy-metal sensing, trafficking and resistance. *Trends Biochem. Sci.* **28**, 170–173 (2003).
252. Bourdon, M. A., Krusius, T., Campbell, S., Schwartz, N. B. & Ruoslahti, E. Identification and synthesis of a recognition signal for the attachment of glycosaminoglycans to proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 3194–3198 (1987).

253. Klein, J. S., Jiang, S., Galimidi, R. P., Keffe, J. R. & Bjorkman, P. J. Design and characterization of structured protein linkers with differing flexibilities. *Protein Eng. Des. Sel. PEDS* **27**, 325–330 (2014).
254. Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673–4680 (1994).
255. Combet, C., Blanchet, C., Geourjon, C. & Deléage, G. NPS@: network protein sequence analysis. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 147–150 (2000).
256. Krnáčová, K., Vesteg, M., Hampl, V., Vlček, Č. & Horváth, A. Euglena gracilis and Trypanosomatids possess common patterns in predicted mitochondrial targeting presequences. *J. Mol. Evol.* **75**, 119–129 (2012).
257. Uboldi, A. D. *et al.* A mitochondrial protein affects cell morphology, mitochondrial segregation and virulence in Leishmania. *Int. J. Parasitol.* **36**, 1499–1514 (2006).
258. Claros, M. G. & Vincens, P. Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *Eur. J. Biochem.* **241**, 779–786 (1996).
259. Ozvegy, C., Váradi, A. & Sarkadi, B. Characterization of drug transport, ATP hydrolysis, and nucleotide trapping by the human ABCG2 multidrug transporter. Modulation of substrate specificity by a point mutation. *J. Biol. Chem.* **277**, 47980–47990 (2002).
260. Leighton, J. & Schatz, G. An ABC transporter in the mitochondrial inner membrane is required for normal growth of yeast. *EMBO J.* **14**, 188–195 (1995).
261. Kispal, G., Csere, P., Prohl, C. & Lill, R. The mitochondrial proteins Atm1p and Nfs1p are essential for biogenesis of cytosolic Fe/S proteins. *EMBO J.* **18**, 3981–3989 (1999).
262. Chloupková, M., LeBard, L. S. & Koeller, D. M. MDL1 is a high copy suppressor of ATM1: evidence for a role in resistance to oxidative stress. *J. Mol. Biol.* **331**, 155–165 (2003).
263. Li, J. & Cowan, J. A. Glutathione-coordinated [2Fe-2S] cluster: a viable physiological substrate for mitochondrial ABCB7 transport. *Chem. Commun. Camb. Engl.* **51**, 2253–2255 (2015).
264. Lill, R. *et al.* The role of mitochondria and the CIA machinery in the maturation of cytosolic and nuclear iron-sulfur proteins. *Eur. J. Cell Biol.* **94**, 280–291 (2015).
265. Monzote, L. & Gille, L. Mitochondria as a promising antiparasitic target. *Curr. Clin. Pharmacol.* **5**, 55–60 (2010).



266. Krauth-Siegel, R. L. & Comini, M. A. Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* **1780**, 1236–1248 (2008).
267. Goodsell, D. S. & Olson, A. J. Automated docking of substrates to proteins by simulated annealing. *Proteins* **8**, 195–202 (1990).
268. Paul, V. D. & Lill, R. Biogenesis of cytosolic and nuclear iron-sulfur proteins and their role in genome stability. *Biochim. Biophys. Acta* **1853**, 1528–1539 (2015).
269. Lill, R., Fekete, Z., Sipos, K. & Rotte, C. Is there an answer? Why are mitochondria essential for life? *IUBMB Life* **57**, 701–703 (2005).
270. Taylor, M. C. & Kelly, J. M. Iron metabolism in trypanosomatids, and its crucial role in infection. *Parasitology* **137**, 899–917 (2010).
271. Qi, W., Li, J. & Cowan, J. A. A structural model for glutathione-complexed iron-sulfur cluster as a substrate for ABCB7-type transporters. *Chem. Commun. Camb. Engl.* **50**, 3795–3798 (2014).
272. Bekri, S. *et al.* Human ABC7 transporter: gene structure and mutation causing X-linked sideroblastic anemia with ataxia with disruption of cytosolic iron-sulfur protein maturation. *Blood* **96**, 3256–3264 (2000).
273. Manta, B. *et al.* Iron-sulfur cluster binding by mitochondrial monothiol glutaredoxin-1 of *Trypanosoma brucei*: molecular basis of iron-sulfur cluster coordination and relevance for parasite infectivity. *Antioxid. Redox Signal.* **19**, 665–682 (2013).
274. Kispal, G., Csere, P., Guiard, B. & Lill, R. The ABC transporter Atm1p is required for mitochondrial iron homeostasis. *FEBS Lett.* **418**, 346–350 (1997).
275. Taketani, S., Kakimoto, K., Ueta, H., Masaki, R. & Furukawa, T. Involvement of ABC7 in the biosynthesis of heme in erythroid cells: interaction of ABC7 with ferrochelatase. *Blood* **101**, 3274–3280 (2003).
276. Dailey, H. A. & Fleming, J. E. Bovine ferrochelatase. Kinetic analysis of inhibition by N-methylprotoporphyrin, manganese, and heme. *J. Biol. Chem.* **258**, 11453–11459 (1983).
277. Rossi, E., Attwood, P. V., Garcia-Webb, P. & Costin, K. A. Inhibition of human lymphocyte ferrochelatase activity by hemin. *Biochim. Biophys. Acta* **1038**, 375–381 (1990).
278. Lill, R. & Mühlenhoff, U. Maturation of iron-sulfur proteins in eukaryotes: mechanisms, connected processes, and diseases. *Annu. Rev. Biochem.* **77**, 669–700 (2008).



279. Basu, S. *et al.* Cytosolic iron-sulphur protein assembly is functionally conserved and essential in procyclic and bloodstream *Trypanosoma brucei*. *Mol. Microbiol.* **93**, 897–910 (2014).
280. Chang, C. S. & Chang, K. P. Heme requirement and acquisition by extracellular and intracellular stages of *Leishmania mexicana amazonensis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **16**, 267–276 (1985).
281. Alsford, S. *et al.* High-throughput phenotyping using parallel sequencing of RNA interference targets in the African trypanosome. *Genome Res.* **21**, 915–924 (2011).
282. Norcliffe, J. L., Alvarez-Ruiz, E., Martin-Plaza, J. J., Steel, P. G. & Denny, P. W. The utility of yeast as a tool for cell-based, target-directed high-throughput screening. *Parasitology* **141**, 8–16 (2014).
283. Denny, P. W. & Steel, P. G. Yeast as a potential vehicle for neglected tropical disease drug discovery. *J. Biomol. Screen.* **20**, 56–63 (2015).
284. Balaña-Fouce, R. & Reguera, R. M. Yeast-based systems for tropical disease drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* **11**, 429–432 (2016).
285. Rycker, M. D. *et al.* A Static-Cidal Assay for *Trypanosoma brucei* to Aid Hit Prioritisation for Progression into Drug Discovery Programmes. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **6**, e1932 (2012).
286. Castillo-Acosta Víctor M. *et al.* Carbohydrate-binding agents act as potent trypanocidals that elicit modifications in VSG glycosylation and reduced virulence in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Microbiol.* **90**, 665–679 (2013).
287. Yeaman, C., Grindstaff, K. K., Wright, J. R. & Nelson, W. J. Sec6/8 complexes on trans-Golgi network and plasma membrane regulate late stages of exocytosis in mammalian cells. *J. Cell Biol.* **155**, 593–604 (2001).
288. Lanz, E., Gregor, M., Slavík, J. & Kotyk, A. Use of FITC as a Fluorescent Probe for Intracellular pH Measurement. *J. Fluoresc.* **7**, 317–319 (1997).
289. Souto-Padrón, T., Chiari, E. & De Souza, W. The surface charge of trypanosomatids of the genus *Trypanosoma*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **85**, 215–219 (1990).
290. Gonzalez-Rey, E., Chorny, A. & Delgado, M. VIP: An Agent with License to Kill Infective Parasites. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1070**, 303–308 (2006).
291. Proto, W. R., Jones, N. G., Coombs, G. H. & Mottram, J. C. Tracking autophagy during proliferation and differentiation of *Trypanosoma brucei*. *Microb. Cell Graz Austria* **1**, 9–20 (2014).



292. Montalban-Lopez, M., Sanchez-Hidalgo, M., Valdivia, E., Martinez-Bueno, M. & Maqueda, M. Are Bacteriocins Underexploited? NOVEL Applications for OLD Antimicrobials. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **12**, 1205–1220 (2011).
293. Hammami, R., Fernandez, B., Lacroix, C. & Fliss, I. Anti-infective properties of bacteriocins: an update. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **70**, 2947–2967 (2013).
294. MacGregor, P., Szöör, B., Savill, N. J. & Matthews, K. R. Trypanosomal immune evasion, chronicity and transmission: an elegant balancing act. *Nat. Rev. Microbiol.* **10**, 431–438 (2012).
295. Bouteille, B., Oukem, O., Bisser, S. & Dumas, M. Treatment perspectives for human African trypanosomiasis. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **17**, 171–181 (2003).
296. De Rycker, M. *et al.* Comparison of a high-throughput high-content intracellular Leishmania donovani assay with an axenic amastigote assay. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**, 2913–2922 (2013).
297. Sánchez-Fernández, E. M. *et al.* Antileishmanial activity of sp<sup>2</sup>-iminosugar derivatives. *RSC Adv.* **5**, 21812–21822 (2015).
298. Belmonte-Reche, E. *et al.* Tyrosol and hydroxytyrosol derivatives as antitrypanosomal and antileishmanial agents. *Eur. J. Med. Chem.* **119**, 132–140 (2016).
299. Bakunova, S. M. *et al.* Structure-activity study of pentamidine analogues as antiprotozoal agents. *J. Med. Chem.* **52**, 2016–2035 (2009).
300. Mendoza, F., Maqueda, M., Gálvez, A., Martínez-Bueno, M. & Valdivia, E. Antilisterial activity of peptide AS-48 and study of changes induced in the cell envelope properties of an AS-48-adapted strain of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 618–625 (1999).
301. Harrington, J. M. Antimicrobial Peptide Killing of African Trypanosomes. *Parasite Immunol.* **33**, 461–469 (2011).
302. Ishiyama, A. *et al.* In vitro and in vivo antitrypanosomal activities of three peptide antibiotics: leucinostatin A and B, alamethicin I and tsushimycin. *J. Antibiot. (Tokyo)* **62**, 303–308 (2009).
303. Hu, Y. & Aksoy, S. An antimicrobial peptide with trypanocidal activity characterized from *Glossina morsitans morsitans*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **35**, 105–115 (2005).
304. Grande Burgos, M. J., Pérez Pulido, R., López Aguayo, M. del C., Gálvez, A. & Lucas, R. The Cyclic Antibacterial Peptide Enterocin AS-48: Isolation, Mode of Action, and Possible Food Applications. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 22706–22727 (2014).

305. Field, M. C. & Carrington, M. The trypanosome flagellar pocket. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**, 775–786 (2009).
306. Morgan, G. W., Allen, C. L., Jeffries, T. R., Hollinshead, M. & Field, M. C. Developmental and morphological regulation of clathrin-mediated endocytosis in *Trypanosoma brucei*. *J. Cell Sci.* **114**, 2605–2615 (2001).
307. Pal, A., Hall, B. S., Nesbeth, D. N., Field, H. I. & Field, M. C. Differential endocytic functions of *Trypanosoma brucei* Rab5 isoforms reveal a glycosylphosphatidylinositol-specific endosomal pathway. *J. Biol. Chem.* **277**, 9529–9539 (2002).
308. Alsford, S., Field, M. C. & Horn, D. Receptor-mediated endocytosis for drug delivery in African trypanosomes: fulfilling Paul Ehrlich's vision of chemotherapy. *Trends Parasitol.* **29**, 207–212 (2013).
309. Barrett, M. P., Boykin, D. W., Brun, R. & Tidwell, R. R. Human African trypanosomiasis: pharmacological re-engagement with a neglected disease. *Br. J. Pharmacol.* **152**, 1155–1171 (2007).
310. Alsford, S. *et al.* High-throughput decoding of antitrypanosomal drug efficacy and resistance. *Nature* **482**, 232–236 (2012).
311. Engstler, M. *et al.* Kinetics of endocytosis and recycling of the GPI-anchored variant surface glycoprotein in *Trypanosoma brucei*. *J. Cell Sci.* **117**, 1105–1115 (2004).
312. Uzcátegui, N. L. *et al.* Antiproliferative Effect of Dihydroxyacetone on *Trypanosoma brucei* Bloodstream Forms: Cell Cycle Progression, Subcellular Alterations, and Cell Death. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 3960–3968 (2007).
313. Jenssen, H., Hamill, P. & Hancock, R. E. W. Peptide Antimicrobial Agents. *Clin. Microbiol. Rev.* **19**, 491–511 (2006).
314. Sánchez-Hidalgo, M. *et al.* Effect of replacing glutamic residues upon the biological activity and stability of the circular enterocin AS-48. *J. Antimicrob. Chemother.* **61**, 1256–1265 (2008).
315. Dezfuli, B. S., Simoni, E., Giari, L. & Manera, M. Effects of experimental terbuthylazine exposure on the cells of *Dicentrarchus labrax* (L.). *Chemosphere* **64**, 1684–1694 (2006).
316. Li, F.-J. *et al.* A role of autophagy in *Trypanosoma brucei* cell death. *Cell. Microbiol.* **14**, 1242–1256 (2012).



317. Tekwani, B. L. & Walker, L. A. 8-Aminoquinolines: future role as antiprotozoal drugs. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **19**, 623–631 (2006).
318. Vale, N., Moreira, R. & Gomes, P. Primaquine revisited six decades after its discovery. *Eur. J. Med. Chem.* **44**, 937–953 (2009).
319. Yeates, C. Sitamaquine (GlaxoSmithKline/Walter Reed Army Institute). *Curr. Opin. Investig. Drugs Lond. Engl.* **2000** **3**, 1446–1452 (2002).
320. Vercesi, A. E. & Docampo, R. Ca<sup>2+</sup> transport by digitonin-permeabilized *Leishmania donovani*. Effects of Ca<sup>2+</sup>, pentamidine and WR-6026 on mitochondrial membrane potential in situ. *Biochem. J.* **284** ( Pt 2), 463–467 (1992).
321. Carvalho, L. *et al.* The 8-aminoquinoline analogue sitamaquine causes oxidative stress in *Leishmania donovani* promastigotes by targeting succinate dehydrogenase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 4204–4210 (2011).
322. Peters, W. The evolution of tafenoquine--antimalarial for a new millennium? *J. R. Soc. Med.* **92**, 345–352 (1999).
323. Kitchener, S., Nasveld, P. & Edstein, M. D. Tafenoquine for the treatment of recurrent *Plasmodium vivax* malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **76**, 494–496 (2007).
324. Crockett, M. & Kain, K. C. Tafenoquine: a promising new antimalarial agent. *Expert Opin. Investig. Drugs* **16**, 705–715 (2007).
325. Yardley, V., Gamarro, F. & Croft, S. L. Antileishmanial and antitrypanosomal activities of the 8-aminoquinoline tafenoquine. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 5356–5358 (2010).
326. Carvalho, L. *et al.* Tafenoquine, an antiplasmodial 8-aminoquinoline, targets *leishmania* respiratory complex III and induces apoptosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 5344–5351 (2010).
327. Jáuregui, M., María, A., Ramos-Escudero, D. F., Alvarado-Ortiz Ureta, C. & Castañeda Castañeda, B. Evaluación de la capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos en recursos vegetales promisorios. *Rev. Soc. Quím. Perú* **73**, 142–149 (2007).
328. Visioli, F. & Bernardini, E. Extra virgin olive oil's polyphenols: biological activities. *Curr. Pharm. Des.* **17**, 786–804 (2011).
329. Bernini, R., Merendino, N., Romani, A. & Velotti, F. Naturally occurring hydroxytyrosol: synthesis and anticancer potential. *Curr. Med. Chem.* **20**, 655–670 (2013).

330. Shakibaei, M., Harikumar, K. B. & Aggarwal, B. B. Resveratrol addiction: To die or not to die. *Mol. Nutr. Food Res.* **53**, 115–128 (2009).
331. Dua, V. K., Verma, G. & Dash, A. P. In vitro antiprotozoal activity of some xanthenes isolated from the roots of *Andrographis paniculata*. *Phytother. Res. PTR* **23**, 126–128 (2009).
332. Kheirandish, F. *et al.* Antileishmanial, antioxidant, and cytotoxic activities of *Quercus infectoria* Olivier extract. *Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother.* **82**, 208–215 (2016).
333. Alves, M. M. de M. *et al.* Gallic and ellagic acids: two natural immunomodulator compounds solve infection of macrophages by *Leishmania major*. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **390**, 893–903 (2017).
334. Carrada López, G. & Castañón Sánchez, C. A. Quercetina atenúa la virulencia de *Staphylococcus aureus* al disminuir la secreción de alfa toxina. *Rev. Argent. Microbiol.* (2017). doi:10.1016/j.ram.2017.07.002
335. Machado, A. J. T. *et al.* Antiparasitic effect of the *Psidium guajava* L. (guava) and *Psidium brownianum* MART. EX DC. (araçá-de-veado) extracts. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* (2018). doi:10.1016/j.fct.2018.03.018
336. Pérez-Victoria, J. M. *et al.* Correlation between the Affinity of Flavonoids Binding to the Cytosolic Site of *Leishmania tropica* Multidrug Transporter and Their Efficiency To Revert Parasite Resistance to Daunomycin. *Biochemistry (Mosc.)* **38**, 1736–1743 (1999).
337. MESA, M. D, RAMÍREZ-TORTOSA, M. C, AGUILERA, C. M, RAMÍREZ-BOSCA, A & GIL, A. Pharmacological and nutritional effects of *Curcuma longa* L. extracts and curcuminoids. *Ars Pharm.* **41**, 307–321 (2000).
338. Griffin, B. D. & Bass, H. W. Review: Plant G-quadruplex (G4) motifs in DNA and RNA; abundant, intriguing sequences of unknown function. *Plant Sci. Int. J. Exp. Plant Biol.* **269**, 143–147 (2018).
339. Ruggiero, E. & Richter, S. N. G-quadruplexes and G-quadruplex ligands: targets and tools in antiviral therapy. *Nucleic Acids Res.* (2018). doi:10.1093/nar/gky187
340. Harris, L. M. & Merrick, C. J. G-quadruplexes in pathogens: a common route to virulence control? *PLoS Pathog.* **11**, e1004562 (2015).



